

**Optimierung der biotechnischen Herstellung von 3-Hydroxypropionaldehyd
aus Glycerin**

—

**Erhöhung der Standzeit und der Produktivität des Biokatalysators
Lactobacillus reuteri SD2112 durch den Fängerstoff Carbohydrazid**

Von der Fakultät für Lebenswissenschaften
der Technischen Universität Carolo-Wilhelmina
zu Braunschweig

zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften

(Dr. rer. nat.)

genehmigte

D i s s e r t a t i o n

von Hendrik Krauter
aus Jena, Thüringen

1. Referent:	Professor Dr. Klaus-Dieter Vorlop
2. Referent:	Professor Dr. Adrian Schumpe
eingereicht am:	17.10.2012
mündliche Prüfung (Disputation) am:	08.03.2013

Druckjahr 2013

Vorveröffentlichungen der Dissertation

Teilergebnisse aus dieser Arbeit wurden mit Genehmigung der Fakultät für Lebenswissenschaften, vertreten durch den Mentor der Arbeit, in folgenden Beiträgen vorab veröffentlicht:

Patente

Haas T, Klasovsky F, Krauter H, Schaffer S, Schöbel R, Tacke T, Vorlop K-D, Willke T und Wessel M (2010) Method for the production by fermentation of (3-Hydroxy) propionaldehyde in the presence of semicarbazide or carbohydrazide. WO/2010/127970 A3 (zusätzlich in DE, EP, BR, CN, ID, IN, JP, RU, SG, US)

Publikationen

Krauter H, Willke T und Vorlop K-D (2012) Production of high amounts of 3-hydroxypropionaldehyde from glycerol by *Lactobacillus reuteri* with strongly increased biocatalyst lifetime and productivity. New Biotechnology 29(2): 211-217

Tagungsbeiträge

Krauter H, Willke T und Vorlop K-D (2010) Production of 3-hydroxypropionaldehyde from glycerol by *Lactobacillus reuteri* - Strong increased biocatalyst lifetime and productivity (Vortrag). 14th International Biotechnology Symposium and Exhibition Biotechnology for the Sustainability of Human Society, Rimini, Italien

Krauter H, Willke T und Vorlop K-D (2010) Production of 3-hydroxypropionaldehyde from glycerol by *Lactobacillus reuteri* - Strong increased biocatalyst lifetime and productivity (Vortrag). 5th International Congress on Biocatalysis, Hamburg

Krauter H, Willke T und Vorlop K-D (2011) Production of 3-hydroxypropionaldehyde from glycerol by *Lactobacillus reuteri* (Poster). Biotechnica, Hannover

Great minds discuss ideas.

Average minds discuss events.

Small minds discuss people.

Anonym

ZUSAMMENFASSUNG

3-Hydroxypropionaldehyd (3HPA) ist als Rohstoff für die chemische Industrie als Grundchemikalie (Acrolein, Acrylsäure, 3-Hydroxypropionsäure) vor allem für Biopolymere oder Superabsorber von großem Interesse. Zudem kann 3HPA in der pharmazeutischen und Lebensmittelindustrie aufgrund seiner bioziden Wirkung auch Anwendung als Antibiotikum, Konservierungsmittel oder biologisches Pflanzenschutzmittel finden. Eine petrochemische Herstellung findet derzeit nur als Zwischenprodukt bei der 1,3-Propandiol synthese statt. Eine biotechnische Herstellung ist durch die Dehydratisierung von Glycerin, einem Nebenprodukt der Biodieselherstellung, möglich. Seit 1960 wurde intensive Forschungsarbeit geleistet und mit dem 3HPA-resistentesten Bakterium *Lactobacillus reuteri* ein Zweistufensystem entwickelt, bei dem eine Trennung der Zellanzucht von der Biotransformation erfolgt. Durch die Eigenschaft, Glycerin nur reduktiv mithilfe der B₁₂-haltigen, sauerstofflabilen Glycerindehydratase (GDHt) zu 3HPA dehydratisieren zu können, führt die Biotransformation von Glycerin ohne Wachstumssubstrat (z.B. Glucose) mit konzentrierter Biomasse zu einer Akkumulation von 3HPA bis zu einer toxischen Konzentration und schließlich zum Zelltod. Dadurch scheitert die Umsetzung in einem biotechnischen Prozess an teuren Produktionskosten des Biokatalysators, an einer extrem kurzen Standzeit aufgrund der Toxizität des Aldehyds 3HPA und somit einer zu geringen Produktivität. Gegenstand dieser Arbeit ist die Untersuchung und Optimierung der Biomasseanzucht und eines biotechnischen Verfahrens zur 3HPA-Herstellung aus Glycerin in einer Biotransformation.

Das zur Optimierung verwendete modulare Doppelfermentersystem mit einem Referenzfermenter wurde eigenständig konzipiert und aufgebaut. Die Datenerfassung der Parameter pH-Wert, Redoxpotential, Temperatur, Sauerstoffpartialdruck und die Massenströme erfolgt komplett digital und die pH-Regelung computergesteuert. Das System ist für unterschiedlichste Fermentationsstrategien ausgelegt, kann aber auch in Verbindung mit anderen Reaktoren für Sauerstoffmessungen oder Titrationsen modular verwendet werden.

Die Kultivierung von *L. reuteri* wurde aufgrund der unzureichenden Zelldichte verbessert. Zum einen konnte durch die Anzucht der Zellen unter strikt anaeroben Bedingungen die Inkubationszeit bei 37°C deutlich reduziert und eine gleichbleibende Biomasseaktivität in der Biotransformation sichergestellt werden. Zum anderen wurde das MRS-Medium optimiert, der Anteil an essentiell benötigtem Fleischextrakt erhöht und der Anteil an Pepton und Hefeextrakt deutlich gesenkt. In einer Fed-Batch-Fermentation konnte unter optimierten Bedingungen die Biotrockenmasse (BTM) um das 2,8fache gesteigert werden.

Durch die Immobilisierung von *L. reuteri* in LentiKats[®] konnte die Toxizität des Produktes 3HPA auf die GDHt nicht gesenkt werden. In Versuchen mit diesen Immobilisaten und dem Fängerstoff Semicarbazid, der das toxische 3HPA bindet, wurde entgegen Literaturangaben sowohl die Ausbeute als auch die Standzeit verbessert. Das entstandene 3HPA erwies sich somit als Hauptgrund für die geringe Standzeit der Biokatalysatoren. Es zeigte sich eine starke Abhängigkeit zwischen der Fängerstoff- und der Glycerinkonzentration, wobei der Fängerstoff mindestens in einem äquivalenten Verhältnis gegenüber dem eingesetzten Glycerin benötigt wird. Auf der Suche nach einer für Mensch und Umwelt weniger toxischen Fängerstoffalternative wurde Carbohydrazid, das aufgrund seiner Bifunktionalität auffiel, näher untersucht. Während der Biotransformation mit *L. reuteri* konnte damit die toxische Wirkung von 3HPA bei mindestens äquivalentem Einsatz immens minimiert und somit die Biokatalysatorstandzeit außerordentlich verlängert werden. In einer Repeated-Batch-Biotransformation unter äquimolarem Einsatz von Carbohydrazid konnten die Immobilisate statt einem Zyklus mindestens 10 Zyklen lang verwendet werden, das einer 33fachen

Verbesserung der Biokatalysatorstandzeit entspricht. Dabei wurden insgesamt 92 g Glycerin zu 67 g 3HPA (kumuliert) umgesetzt, dass einer Erhöhung der 3HPA-Produktion um das 67fache gleichkommt. Außerdem konnte eine Ausbeute von 0,78 g/g (0,90 mol/mol) gegenüber einer theoretisch maximalen Ausbeute von 0,81 g/g (1 mol/mol) erreicht werden. In weiteren Optimierungsversuchen mit Zellsuspensionen (7 g BTM/L) wurde in einer Batch-Biotransformation bei 35°C und pH 7 in 14 h 150 g/L 3HPA (2 M) und in einer Fed-Batch-Biotransformation bei 45°C und pH 7 in 5 h 107 g/L 3HPA (1,4 M) produziert. Dies entspricht einer Produktivität von 11,3 g·L⁻¹·h⁻¹ im Batch bzw. 21,6 g·L⁻¹·h⁻¹ im Fed-Batch.

Bei der Verwendung von äquimolaren Mengen Carbohydrazid und Glycerin konnte auch die in der Literatur beschriebene Bildung von 1,3-Propandiol (1,3-PDO) und 3-Hydroxypropionsäure (3HP) beobachtet werden. Durch die Verwendung des Fängerstoffs im Überschuss wurden diese Nebenprodukte von 10% auf 2% reduziert. Welche Enzyme an dieser enzymatischen Dismutation beteiligt sind, ist jedoch unbekannt. Weiterhin konnte ein stark negativer Sauerstoffeinfluss während der Biotransformation auf die GDHt-Aktivität gezeigt werden, wobei der Fängerstoff Carbohydrazid aufgrund seiner Sauerstoffbindung eine zusätzliche positive Wirkung offenbarte.

Der Einsatz der Fängerstoffe hatte jedoch negative Einflüsse auf die bisher verwendete HPLC-Analytik, bei der die Hydrazinogruppen irreversibel mit dem Säulenmaterial interagierten und es zum Verlust der Trennleistung kam. Dadurch wurde aufgrund der Robustheit des colorimetrischen Tests ausschließlich dieser zum Quantifizieren von 3HPA verwendet. In einer alternativen Analytik mit einem C₁₈-RP-Säulenmaterial konnten bei pH-neutralen Bedingungen nur die zwei möglichen Carbazone von Carbohydrazid und 3HPA sowie Acrolein sicher getrennt werden.

Letztendlich ist es gelungen, die Kosten für einen biotechnischen Prozess zur Herstellung von 3HPA aus Glycerin aufgrund der Verbesserung der Biomasseanzucht, der Erhöhung der Produktkonzentration und der Biokatalysatorstandzeit deutlich zu senken.

INHALTSVERZEICHNIS

ABBILDUNGSVERZEICHNIS	V
TABELLENVERZEICHNIS	X
GLEICHUNGSVERZEICHNIS	XI
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	XII
1. Einleitung & Zielsetzung	1
1.1 Biotechnische Nutzung von Glycerin als Alternative zur Petrochemie	1
1.2 3-Hydroxypropionaldehyd als universeller Grundbaustein	1
1.3 Petrochemische Herstellung von 3HPA	4
1.4 Biologische Herstellung von 3HPA	5
1.4.1 Eigenschaften der Glycerindehydratase und deren Reaktionsmechanismus	5
1.4.2 Verbreitung des Glycerinabbaus	7
1.4.3 <i>Lactobacillaceae</i> – <i>Lactobacillus reuteri</i>	8
1.5 Biotechnische Herstellung von 3HPA	10
1.6 Verwendung von Aldehydfängerstoffen	13
1.7 Immobilisierung	14
1.7.1 Quervernetzung mit Glutardialdehyd	15
1.7.2 Matriceinschluss - LentiKats®	15
1.7.4 Immobilisierung von <i>L. reuteri</i>	17
1.8 Zielsetzung	18
2. Material & Methoden	19
2.1 Doppelfermentersystem-Entwicklung	19
2.2 Bakterienstamm und Zellanzucht	21
2.2.1 <i>Lactobacillus reuteri</i> SD2112	21
2.2.2 Mikroskopie	22
2.2.3 Mediumherstellung und Anzucht im Batch-Verfahren	22
2.2.4 Supplinooptimierung in einer 0,2-L-Fed-Batch-Fermentation	24
2.2.5 Biomasseanzucht in einer Fed-Batch Fermentation im BiostatE®	26
2.2.6 Zellernte und Zellsuspensionsherstellung	28
2.3 Stammhaltung	28
2.3.1 -80°C - Stammhaltung	28
2.3.2 -80°C - Zellen für Optimierungsversuche	28
2.4 Immobilisierung	29
2.4.1 Einfluss von Glutardialdehyd bei der Quervernetzung der Zellbestandteile	29

2.4.2	Immobilisierung von <i>L. reuteri</i> in LentiKats®	29
2.5	Biotransformation.....	30
2.5.1	Biotransformation ohne pH-Regelung.....	31
2.5.1.1	Einfluss der Lagerungstemperatur	31
2.5.2	Biotransformation mit pH-Regelung.....	31
2.5.2.1	Glucosezugabe für die Regenerierung des B ₁₂ -Koenzyms.....	31
2.6	Aktivitätsbestimmung der 3HPA-Bildung	32
2.7	Analytik	32
2.7.1	Flüssigkeitschromatographie	32
2.7.1.1	Analytische Chromatographie	32
2.7.1.2	Schnelle Glucosebestimmung zur Fermentationsüberwachung.....	33
2.7.1.3	Präparative Chromatographie	33
2.7.2	Massenspektrometrie.....	34
2.7.3	Colorimetrischer Test zur 3HPA-Bestimmung	34
2.7.4	Korrelationen OD ₆₀₀ -Zellzahl-BTM	34
2.7.5	pK _B -Bestimmung der Fängerstoffe	35
2.7.6	Sauerstoffentfernung der Fängerstoffe in Wasser	36
2.8	Chemikalienliste.....	37
3.	Ergebnisse	38
3.1	Optimierung der Zellanzucht	38
3.1.1	Optimierung des Mediums	38
3.1.2	Sauerstoffeinfluss während der Zellanzucht	39
3.1.3	Enzymaktivität in einer Batch-Fermentation.....	40
3.1.4	Einfluss verschiedener Supplines auf die Fed-Batch-Kultivierung	41
3.1.5	Enzymaktivität in einer Fed-Batch-Fermentation.....	42
3.2	Biotransformation mit <i>Lactobacillus reuteri</i> ohne Fängerstoffzugabe.....	44
3.2.1	Temperaturabhängiger Aktivitätsverlust gelagerter Zellsuspensionen	44
3.2.2	Langzeitaktivitätsstabilisierung durch Quervernetzung der Zellbestandteile	44
3.2.3	Glucosezugabe für die Regenerierung des B ₁₂ -Koenzyms	45
3.3	Carbohydrazid und dessen Reaktion mit 3HPA	47
3.3.1	pK _B -Bestimmung von Carbohydrazid und Semicarbazid	47
3.3.2	Präparative chromatographische Aufreinigung von 3HPA.....	49
3.3.3	Massenspektrometrische Untersuchung der 3HPA-Carbazonbildung	50
3.4	Biotransformation mit <i>L. reuteri</i> in LentiKats® mit Fängerstoffzugabe.....	52
3.4.1	Einfluss der LentiKat® -Komponenten auf die 3HPA-Bildung.....	52

3.4.2	Einfluss von verschiedenen Fängerstoffen auf die 3HPA-Produktion	52
3.4.3	Verschiebung des pH-Optimums durch den Fängerstoffeinsatz	54
3.5	Optimierung der Biotransformation mit Carbohydrazid	55
3.5.1	Lagerungsstabilität aktiver Biomasse bei -80°C	55
3.5.2	Herstellung der Biomasse für Optimierungsversuche im 10-L-Maßstab	56
3.5.3	Optimierung der eingesetzten Glycerin- und Carbohydrazidkonzentration	58
3.5.4	Optimierung von pH-Wert und Temperatur	61
3.5.5	Temperaturstabilitätstest in einer Fed-Batch-Biotransformation	63
3.6	Sauerstoffeinfluss auf die 3HPA-Bildung	64
3.6.1	Sauerstoffexposition der Immobilisate während der LentiKat [®] -Herstellung	64
3.6.2	Sauerstoffeinfluss während der Biotransformation mit LentiKats [®]	65
3.6.3	Sauerstoffentfernung durch Carbohydrazid und Semicarbazid	67
3.7	Nebenproduktbildung	67
3.7.1	Enzymatische Dismutation von 3HPA zu 1,3-PDO und 3HP	67
3.7.2	Hemmung der Dismutation durch Fängerstoffe	69
3.7.3	Acroleinbildung als Artefakt während der Probenlagerung	70
3.7.4	Farbstoffbildung durch Carbohydrazidzugabe	72
3.8	Alternative Substrate	72
3.9	Analytik	77
3.9.1	HPLC	77
3.9.1.1	Bestimmung der 3-Hydroxypropionsäure	81
3.9.1.2	Verlust der HPLC-Trennungseigenschaften durch Hydrazide	84
3.9.1.3	Alternative HPLC-Analytik mit ODS-Hypersil	86
3.9.2	Colorimetrischer Test	87
3.9.2.1	Einfluss der Fängerstoffe auf den colorimetrischen Test	87
3.9.2.2	Einfluss erhöhter Aldehydmengen im colorimetrischen Test	89
4.	Diskussion	90
4.1	Optimierung der Zellanzucht	90
4.2	Biotransformation mit <i>L. reuteri</i> ohne Fängerstoffzugabe	92
4.3	Carbohydrazid und dessen Reaktion mit 3HPA	93
4.4	Biotransformation mit <i>L. reuteri</i> mit Fängerstoffzugabe	95
4.5	Optimierung der Biotransformation mit suspendierten Zellen	100
4.6	Sauerstoffeinfluss auf die Biotransformation	102
4.7	Nebenproduktbildung bei der Biotransformation von Glycerin	104
4.8	Biotransformation alternativer Substrate durch <i>L. reuteri</i>	107

4.9	Alternative Fängerstoffe zur Detoxifizierung von 3HPA	108
4.10	Analytik	110
4.11	Mögliche industrielle Umsetzung	111
5.	Schlussfolgerung & Ausblick	115
6.	Literatur	116
7.	Anhang	134
7.1	DasyLab®-Schaltpläne	134
7.1.1	Optimiertes Schaltbild für das Doppelfermentersystem zur Biotransformation und Biomasseanzucht im Fed-Batch	134
7.1.2	Erweitertes Schaltbild für BiostatE® zur Biomasseanzucht im 10-L-Fed-Batch	138
	Danksagung	139
	Curriculum Vitae	140

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abb. 1: Rohstoffpreisentwicklung ; (A) Erdöl-Brent Oil (Quelle: U.S. Energy Information Administration) und (B) Pharmaglycerin (Quelle: Oleofine, (*) Quelle: ICISpricing.com 20.01.2012)	1
Abb. 2: Dynamisches 3HPA-System ; Verteilung des Monomers, Dimers und des Hydrats nach (A) Talarico und Dobrogosz (1989) und (B) die Erweiterung in Abhängigkeit von der Konzentration nach Vollenweider et al. (2003) in D ₂ O bei 20°C	3
Abb. 3: Übersicht der Anwendungsgebiete für 3HPA ; verändert nach Vollenweider und Lacroix (2004)	4
Abb. 4: Verfahren zur Herstellung von 1,3-PDO mit 3HPA als Zwischenprodukt ; erweitert nach Steverding (2010)	4
Abb. 5: Getrennter Stoffwechselweg von Glucose und Glycerin bei <i>L. reuteri</i> mit 3HPA-System ; Vereinfachte Darstellung der Glykolyse und des Pentosephosphatwegs, zusätzlich Verwertung von Fructose, ■ = Substrat, ■ = Endprodukt, P = Phosphat	9
Abb. 6: Struktur des Pseudovitamin-B₁₂ im Vergleich zum Koenzym-B₁₂ ; Radikalbildung zwischen dem Cobaltatom und dem α-Ligand, DMB = Dimethylbenzimidazol, P=Phosphat	10
Abb. 7: Übersicht über Immobilisierungsmethoden ; nach Hartmeier (1986)	14
Abb. 8: Schematische Darstellung eines LentiKat®-Immobilisates ; (A) Übersicht (Quelle GeniaLab®) und (B) schematische Kompartimentierung der Biokatalysatoren (■) im Querschnitt	16
Abb. 9: Doppelfermenteranlage mit computergestützter, digitaler Regelung und Datenerfassung ; (A) Photographie und (B) schematische Darstellung (nicht gezeigt Thermostate zur Temperaturregelung der Fermenter und der Abluftkühlung)	20
Abb. 10: Verwendete Fermenter ; Maximalvolumen von (A) 90 mL, (B) 500 mL und (C) 1000 mL, A und B mit LentiKat®-Immobilisaten, C mit Zellsuspension von <i>L. reuteri</i>	21
Abb. 11: Lichtmikroskopische Aufnahme von <i>L. reuteri</i> SD2112 ; Balken entspricht 20 µm	22
Abb. 12: Anaerobisierungsanlage nach Neumann (1993) ; Entfernung von Restsauerstoff für anaerobe Medien bzw. Lösungen	23
Abb. 13: 10-L-Biomasseherstellung für Optimierungsversuche im BiostatE®-Fermenterstand ; (A) Photographie und (B) schematische Darstellung (37°C, pH 5,5, 100 rpm, anaerob)	27
Abb. 14: Herstellung von LentiKats® ; (A) LentiKat®-Printer, (B) aktive Trocknung der Immobilisate durch ein Gebläse, Stabilisierung unter (C) aeroben und (D) anaeroben (Anaerobier Bank Bactron IV, Sheldon, USA) Bedingungen	30
Abb. 15: Manuelle Fraktionierung von 3HPA aus dem HPLC-Eluentenstrom ; 500 µL fängerstofffreie Biotransformationsprobe, HPX-87H-Vorsäule (30x4,6 mm), HPX-87H-Hauptsäule (300x7,8 mm), 40°C, 0,5 mL/min 5 mM H ₂ SO ₄ , 1000 µL Probenschleifenvolumen, Fraktionierung in 3 Tropfen ≈ 100 µL	33
Abb. 16: Biomassekorrelationen ; (A) Zellzahl und (B) BTM korreliert mit der optischen Dichte bei 600 nm	35
Abb. 17: Bestimmung der Sauerstoffentfernung durch Carbohydrazid und Semicarbazid in wässrigen Medien ; temperierbarer, luftdichter Minireaktor mit optischer Sauerstoffmessung (Fibox 3, OIM-PSt3-D12/L120-L2.5, Presens, Regensburg, Dtl.)	36
Abb. 18: Optimierung der Mediumherstellung ; Wachstumsverlauf von <i>L. reuteri</i> in MRS-Komplettmedium und Medium mit separater Glucosezugabe nach dem Autoklavieren (2 % Inokulum, 37°C, pH ungeregt, nicht geschüttelt, mikroaerob)	38
Abb. 19: Sauerstoffeinfluss auf das Wachstum von <i>L. reuteri</i> ; (A) Glucose-, (B) Glycerin-Verbrauch, (C) optische Dichte, (D) 1,3-Propandiol-Bildung, aerobe Bedingungen: geschüttelte halboffene Inkubation, mikroaerobe Bedingungen: nicht geschüttelte halboffene Inkubation, anaerobe Bedingungen: anaerobisierte Medien/Gebinde sowie geschüttelte, geschlossene Inkubation (1 % Inokulum, 37°C, pH ungeregt)	39
Abb. 20: Abhängigkeit der Aktivität von der Wachstumsphase von <i>L. reuteri</i> in einer 1-L-Batch-Fermentation ; (A) Wachstums- und Metabolitverlauf (37°C, pH-ungeregt, 80 rpm, anaerob), (B) Aktivität der Ganzzellkatalysatoren in der Biotransformation (10 ¹⁰ Zellen/mL, ohne Fängerstoff, 35°C, pH 6, 500 rpm, anaerob), idealer Erntezeitpunkt: 11 h (Pfeil)	40

Abb. 21: Optimierung der Biomasseproduktion in der Fed-Batch-Fermentation bei pH 7 ; Einfluss verschiedener Supplinelösungen auf die optische Dichte, Zugabe gekoppelt an den Glucosefeed, Beginn Feed ab 5 h, Fed-Batch-Fermentation (200 mL, 3 % Inokulum, 37°C, pH 7, 500 rpm, anaerob), Batch-Fermentation (1000 mL, 1 % Inokulum, 37°C, pH 6,2, 80 rpm, anaerob)	41
Abb. 22: Einfluss des pH-Wertes auf das Wachstum von <i>L. reuteri</i> ; 8-L-Fed-Batch (3 % Inokulum, 37°C, 100 rpm, anaerob, Beginn Feed ab 5 h), 0,2-L-Fed-Batch (3 % Inokulum, 37°C, 500 rpm, anaerob, Beginn Feed ab 5 h), 1-L-Batch (1 % Inokulum, 37°C, 80 rpm, anaerob, Schraubdeckelflasche)	42
Abb. 23: Abhängigkeit der Aktivität von der Wachstumsphase von <i>L. reuteri</i> im 8-L-Fed-Batch ; (A) Wachstums- und Metabolitverlauf (37°C, pH 5,5, 100 rpm, anaerob), (B) Aktivitäten der Ganzzellkatalysatoren in der Biotransformation (10^{10} Zellen/mL, 520 mM Carbohydrazid, 35°C, pH 7, 500 rpm, anaerob), idealer Erntezeitpunkt 9 h (Pfeil)	43
Abb. 24: Lagerungsbedingter Aktivitätsverlust von Zellsuspensionen bei unterschiedlichen Temperaturen ; anaerobe Lagerung pH 7-gepufferter Zellsuspensionen von <i>L. reuteri</i> bei 4°C, 22°C und 35°C, Biotransformation: $2 \cdot 10^{10}$ Zellen/mL, ohne Fängerstoff, 35°C, pH 5 - ungeregt, anaerob	44
Abb. 25: Quervernetzung von <i>L. reuteri</i> durch Glutardialdehyd ; Einfluss der Glutardialdehydkonzentration auf die Überlebensrate und die spezifische Aktivität in der Biotransformation (10^{10} Zellen/mL, ohne Fängerstoff, 35°C, pH ungeregt, anaerob)	45
Abb. 26: Einfluss der Glucosezugabe während der Biotransformation ; Zugabe von Glucose in Fermenter 1 nach 100 min, in Fermenter 2 nach 0 min und 100 min, (A) Verlauf von Glucose und Lactat, (B) Metabolitverlauf von Glycerin, 3HPA und 1,3-PDO (10^{10} Zellen/mL, ohne Fängerstoff, 35°C, pH 5, 500 rpm, anaerob).....	46
Abb. 27: pK_s-Wert-Bestimmung durch Titration der Fängerstoffe Carbohydrazid und Semicarbazid in wässriger Lösung bei 35°C ; (A) 1 M Carbohydrazid mit 1 M HCL und 1 M KOH titriert, (B) 1 M Carbohydrazid mit 1 M HCL angesäuert und mit 1 M KOH titriert, (C) 1 M Semicarbazid/HCL mit 1 M KOH titriert	48
Abb. 28: Präparative Aufreinigung von 3HPA mittels HPLC ; Fraktionierung von (A) 1000 µL und (B) 500 µL Probenvolumen, Flächenbestimmung für Glycerin, 3HPA und 1,3-PDO im RID- und 3HP im UVD-Chromatogramm (Biotransformationsprobe ohne Fängerstoffzugabe, HPX-87H-Vorsäule (30x4,6 mm), HPX-87H-Hauptsäule (300x7,8 mm), 40°C, 0,5 mL/min 5 mM H ₂ SO ₄ , 1000 µL Probenschleife, Fraktionierung in 3 Tropfen \cong 5 sec \cong 100 µL).....	50
Abb. 29: Massenspektrometrischer Nachweis der verschiedenen Carbazone ; MS-Spektrum von aufgereinigtem 3HPA und Carbohydrazid (A) in der molaren Mischung 1,2:1 und (B) mit 3HPA im Überschuss	51
Abb. 30: Einfluss von unbeladenen LentiKats® auf die Biotransformation von <i>L. reuteri</i> in Zellsuspension ; (10^{10} Zellen/mL, ohne Fängerstoff, 35°C, pH 5 - ungeregt, 500 rpm, anaerob)	52
Abb. 31: Produktion von 3HPA in einer Repeated-Batch-Biotransformation mit <i>L. reuteri</i> in LentiKats® und unterschiedlichen Fängerstoffen ; Vergleich der aufsummierten, produzierten Menge 3HPA mit 10 % (w/v) LentiKats® und unterschiedlichen Fängerstoffen bzw. Fängerstoffkonzentrationen (200 mL, 500 mM Glycerin, pH 7, 35°C, 500 rpm, anaerob), Wiederverwendung der Immobilisate in jedem Zyklus.....	53
Abb. 32: pH-Wert-Abhängigkeit der Biotransformation ; Vergleich der Biotransformationsaktivität bei unterschiedlichem pH-Wert mit und ohne Carbohydrazid (10 % LentiKats®, 200 mL, 500 mM Glycerin, 35°C, 500 rpm, anaerob)	54
Abb. 33: Auswirkung der Lagerung von <i>L. reuteri</i> bei -80°C auf die 3HPA-Bildung ; Vergleich der Biotransformationen vor und nach der Lagerung mit 20 % (v/v) DMSO bei -80°C (10^{10} Zellen/mL, 35°C, pH 7, 500 rpm, anaerob)	55
Abb. 34: Herstellung aktiver <i>L. reuteri</i> Biomasse im BiostatE® mittels 10-L-Fed-Batch-Fermentation ; (A) Konzentrationsverläufe, (B) Feedzugabe und Redoxpotential, (C) Fermentationsbedingungen, Biomasseernte nach 10,2 h, (37°C, pH 5,5, 100 rpm, anaerob).....	57

Abb. 35: Einzeloptimierung der Biotransformation bezüglich der Glycerin- und Carbohydrazidkonzentration mit <i>L. reuteri</i> in Zellsuspension ; Einfluss von (A) Carbohydrazid und (B) Glycerin auf die spezifische Aktivität unter jeweils konstanten Bedingungen (10 ¹⁰ Zellen/mL, 35°C, pH 7, 500 rpm, anaerob)	59
Abb. 36: Optimierung der Biotransformation bezüglich der Glycerin- und Carbohydrazidkonzentration mit <i>L. reuteri</i> in Zellsuspension ; Abhängigkeit der (A) spezifische Aktivität, der (B) 3HPA-Endkonzentration und der (C) Produktivität von der Glycerin- und Carbohydrazidkonzentration (10 ¹⁰ Zellen/mL, 35°C, pH 7, 500 rpm, anaerob), ● = Messpunkt.....	60
Abb. 37: Vergleich der Batch-Biotransformation mit der höchsten 3HPA-Endkonzentration, spezifische Aktivität und Produktivität ; gleiche Skalierung der Ordinatenachsen (10 ¹⁰ Zellen/mL, pH 7, 35°C, anaerob).....	61
Abb. 38: Einzeloptimierung der Biotransformation bezüglich von Temperatur und pH-Wert mit <i>L. reuteri</i> in Zellsuspension ; Einfluss der (A) Temperatur und des (B) pH-Wertes auf die spezifische Aktivität unter jeweils konstanten Bedingungen (10 ¹⁰ Zellen/mL, 500 mM Glycerin, 520 mM Carbohydrazid, 500 rpm, anaerob)	62
Abb. 39: Optimierung der Biotransformation bezüglich Temperatur und pH-Wert mit <i>L. reuteri</i> in Zellsuspension ; (10 ¹⁰ Zellen/mL, 500 mM Glycerin, 520 mM Carbohydrazid, 500 rpm, anaerob), ● = Messpunkt.....	63
Abb. 40: Temperaturstabilität der GDHt von <i>L. reuteri</i> in der Biotransformation ; Fed-Batch-Verfahren (10 ¹⁰ Zellen/mL, 2 M Carbohydrazid, pH 7, 500 rpm, anaerob)	64
Abb. 41: Optimierung der LentiKats[®]-Herstellung ; Einfluss der Stabilisierungszeit bzw. einer anschließenden mikroaeroben Regenerierung der Biomasse auf die Biotransformation (10 % (w/v) LentiKats [®] , 500 mM Glycerin, 35°C, pH 6 – ungeregt, 500 rpm, anaerob).....	65
Abb. 42: Sauerstoffeinfluss auf die 3HPA-Bildung von <i>L. reuteri</i> beladenen LentiKats[®] ; Biotransformation (A) ohne und (B) mit 520 mM Carbohydrazid, Wiederverwendung der Immobilisate (10 % (w/v) LentiKats [®] , 500 mM Glycerin, 35°C, pH 7, 500 rpm, anaerob)	66
Abb. 43: Temperaturabhängige Sauerstoffentfernung durch Carbohydrazid und Semicarbazid ; gleiche Skalierung der Ordinatenachsen (74 mL Reaktorvolumen, 500 mM Fängerstoff, 500 rpm)	67
Abb. 44: Repeated-Batch-Biotransformation mit <i>L. reuteri</i> in LentiKats[®] und 520 mM Carbohydrazid ; Konzentrationsverläufe von (A) Glycerin und 3HPA, (B) 3HP (KOH-Signal) und 1,3-PDO über 10 Zyklen, Wiederverwendung der Biomasse in jedem Zyklus (200 mL, 10 % (w/v) LentiKats [®] , 500 mM Glycerin, 35°C, pH 7, 500 rpm, anaerob)	68
Abb. 45: Korrelation von 3HP und 1,3-PDO ; Korrelationsfaktor von 1,3-PDO (Peakfläche, RID-Chromatogramm) und der 3HP (Peakhöhe, UVD-Chromatogramm) über 10 Zyklen Biotransformation mit <i>L. reuteri</i> bei Wiederverwendung der Immobilisate (10 % (w/v) LentiKats [®] , 500 mM Glycerin, 520 mM Carbohydrazid, 35°C, pH 7, 500 rpm, anaerob).....	69
Abb. 46: Einfluss der Carbohydrazidkonzentration auf die 3HP-Bildung ; Biotransformationen mit Zellsuspensionen von <i>L. reuteri</i> , Bestimmung der 3HP durch die verbrauchte KOH-Menge (10 ¹⁰ Zellen/mL, 500 mM Glycerin, 35°C, pH 7, 500 rpm, anaerob).....	70
Abb. 47: Acroleinbildung während der HPLC-Probenlagerung ; Lagerungsbedingter Abbau von 3HPA zu Acrolein im Autosampler der HPLC bei Raumtemperatur, Biotransformationsprobe nach 0, 30 und 60 min vermessen (A) RID- und (B) UVD-Chromatogramm (HPX-87H-Vorsäule (30x4,6 mm), HPX-87H-Hauptsäule (300x7,8 mm), 40°C, 0,6 mL/min 5 mM H ₂ SO ₄ , 10 µL Probenvolumen).....	71
Abb. 48: Farbreaktion der Biotransformationsbrühe mit Fängerstoffen ; (A) ohne Fängerstoff, (B) mit Semicarbazid und (C) mit Carbohydrazid bei Lagerung unter Sauerstoffatmosphäre	72
Abb. 49: Biotransformation alternativer Substrate von <i>L. reuteri</i> ohne Fängerstoffzugabe ; (A) 500 mM Glycerin, (B) 500 mM 1,2-PDO, (C) 500 mM 1,2-EtOH (10 ¹⁰ Zellen/mL, 35°C, pH 7, 500 rpm, anaerob)	74
Abb. 50: Biotransformation alternativer Substrate von <i>L. reuteri</i> mit Fängerstoffzugabe ; (A) 500 mM Glycerin, (B) 500 mM 1,2-PDO, (C) 500 mM 1,2-EtOH (10 ¹⁰ Zellen/mL, 520 mM Carbohydrazid, 35°C, pH 7, 500 rpm, anaerob)	75

Abb. 51: Hemmung der Nebenproduktbildung durch Zugabe von Carbohydrazid ; Reduktion der Bildungsgeschwindigkeit der korrespondierenden Säure und des Alkohols aus den jeweiligen Aldehyden durch die Zugabe von 520 mM Carbohydrazid (500 mM Substrat, 10^{10} Zellen/mL, 35°C, pH 7, 500 rpm, anaerob)	76
Abb. 52: Auftrennung biotransformationsrelevanter Stoffe mittels HPLC ; Chromatogramme (A) des RI- und (B) des UV-Detektors, Acroleinprobe enthält chemisch bedingt 3HPA, 3HPA-Biotransformationsprobe ohne Fängerstoff (HPX-87H-Vorsäule (30x4,6 mm), HPX-87H-Hauptsäule (300x7,8 mm), 40°C, 0,6 mL/min 5 mM H ₂ SO ₄ , 10 µL Probenvolumen, 10 mM Standardlösungen)	78
Abb. 53: Auftrennung fermentationsrelevanter Stoffe mittels HPLC ; Chromatogramme (A) des RI- und (B) des UV-Detektors (HPX-87H-Vorsäule (30x4,6 mm), HPX-87H-Hauptsäule (300x7,8 mm), 40°C, 0,6 mL/min 5 mM H ₂ SO ₄ , 10 µL Probenvolumen, 10 mM Standardlösungen)	79
Abb. 54: Auftrennung alternativer Substrate und deren Folgeprodukte mittels HPLC ; Chromatogramme (A) des RI- und (B) des UV-Detektors, (*) keine quantitative Analyse aufgrund schlechter Trennung (HPX-87H-Vorsäule (30x4,6 mm), HPX-87H-Hauptsäule (300x7,8 mm), 40°C, 0,6 mL/min 5 mM H ₂ SO ₄ , 10 µL Probenvolumen, 10 mM Standardlösungen)	80
Abb. 55: Verkürzte Glucosebestimmung mittels zweier HPX-87H Vorsäulen im Vergleich zur Standardanalytik ; HPLC-Chromatogramm des RI-Detektors im Vergleich zur herkömmlichen Analytik (HPX-87H-Vorsäule (30x4,6 mm), HPX-87H-Hauptsäule (300x7,8 mm), 40°C, 0,6 mL/min 5 mM H ₂ SO ₄ , 10 mM Standardlösungen)	81
Abb. 56: Identifizierung der 3HP-Retentionszeit im HPLC-Chromatogramm mit Massenverteilung der NMR-Analyse ; Chromatogramm einer 100 mM 3HP-Standardlösung (HPX-87H-Vorsäule (30x4,6 mm), HPX-87H-Hauptsäule (300x7,8 mm), 40°C, 0,6 mL/min 5 mM H ₂ SO ₄)	82
Abb. 57: 3HP-Standardaddition ; HPLC-Chromatogramm des (A) RID- und (B) des UVD-Signals (210 nm) der Biotransformationsprobe mit und ohne Standardaddition von 3HP (HPX-87H-Vorsäule (30x4,6 mm), HPX-87H-Hauptsäule (300x7,8 mm), 40°C, 0,6 mL/min 5 mM H ₂ SO ₄)	83
Abb. 58: Koelution eines unbekannten Stoffes mit 3HP ; HPLC-Chromatogramm des UVD (210 nm) und des RID-Signals einer Biotransformationsprobe (HPX-87H-Vorsäule (30x4,6 mm), HPX-87H-Hauptsäule (300x7,8 mm), 40°C, 0,6 mL/min 5 mM H ₂ SO ₄)	84
Abb. 59: Verlust der Trennungseigenschaften des HPX-87H-Säulenmaterials durch Carbohydrazid ; RID-Chromatogramm einer Mixstandardlösung (10 mM Glycerin, 10 mM 1,3-Propandiol) (A) vor und (B) nach Sättigung mit 5 mM H ₂ SO ₄ plus 50 mM Carbohydrazid (HPX-87H-Vorsäule (30x4,6 mm), HPX-87H-Hauptsäule (300x7,8 mm), 40°C, 0,6 mL/min 5 mM H ₂ SO ₄ , 10 µL Probenvolumen)	85
Abb. 60: Alternative HPLC-Analytik mit ODS-Hypersil 120A ; Übersicht biotransformationsrelevanter Standardlösungen und deren Signale im (A) RI- und (B) UV-Detektor bei 210 nm (ODS-Hypersil-Säule 120A (125x4,6 mm), 0,5 mL/min 5 % Methanol in 0,1 M KPP pH 4,5, 30°C, 10 µL Probenvolumen)	87
Abb. 61: Einfluss der Fängerstoffe auf den colorimetrischen Test ; 0,5 M Fängerstoffkonzentration im Testansatz entsprechen bei einer regulären 1:100 Probenverdünnung 50 M im Probenansatz	88
Abb. 62: Überprüfung der Messgrenze des colorimetrischen Tests ; (A) Färbung des Testansatzes, (B) Extinktion bei 560 nm in Abhängigkeit von der Acroleinkonzentration	89
Abb. 63: Optimierte Biomasseanzucht von <i>L. reuteri</i> ; anaerobe Bedingungen, Batch-Fermentationen	92
Abb. 64: Vergleich der 3HPA-Bildung in einer Repeated-Batch-Biotransformation mit <i>L. reuteri</i>-LentiKats®-Immobilisaten und 520 mM Carbohydrazid zur Literatur ; aufsummierte, produzierte 3HPA-Menge mit 10 % (w/v) LentiKats®, Wiederverwendung der Biomasse in jedem Zyklus (200 mL, 500 mM Glycerin, pH 7, 35°C, anaerob), Fed-Batch-Fermentation nach Ulmer und Zeng, 2007 (14 g BTM/L Gesamtbioasse <i>K. pneumoniae</i> , 825 mM Semicarbazid, 956 mM Glycerin, pH 6, 30°C, limitierte Sauerstoffverfügbarkeit), Batch-Fermentation nach Vancauwenberge et al., 1990 (14,5 g BTM/L <i>K. pneumoniae</i> NRRL B-4011, 359 mM Semicarbazid, 760 mM Glycerin, pH 6, 28°C), (*) Literaturdaten an den verwendeten Versuchsaufbau angepasst	96

Abb. 65: Unterteilung der Glycerin- und Carbohydrazidkonzentrationsverhältnisse bezüglich des erwarteten Biomasseschutzes ; ①-rot Carbohydrazid im äquivalentem Unterschuss, ②-gelb Carbohydrazidkonzentration zwischen äquivalent und äquimolar, ③-grün Carbohydrazid mehr als doppelter Überschuss zur eingesetztem Glycerinkonzentration (50 mL, 10^{10} Zellen/mL <i>L. reuteri</i> , 35°C, pH 7, 500 rpm, anaerob).....	100
Abb. 66: 3HPA-Produktion bei verschiedenen Fütterungsstrategien im Vergleich zur Literatur ; Batch <i>L. reuteri</i> (2 M Carbohydrazid, 2 M Glycerin, 7 g BTM/L, pH 7, 35°C, anaerob), Fed-Batch <i>L. reuteri</i> (1 M Carbohydrazid, 1,5 M Glycerin, 7 g BTM/L, pH 7, 45°C, anaerob), Batch <i>K. pneumoniae</i> nach Ulmer und Zeng, 2007 (825 mM Semicarbazid, 956 mM Glycerin, 14 g BTM/L, pH 6, 30°C, limitierte Sauerstoffverfügbarkeit), Batch <i>K. pneumoniae</i> NRRL B-4011 nach Vancauwenberge et al. 1990 (359 mM Semicarbazid, 760 mM Glycerin, 14,5 g BTM/L, pH 6, 28°C).....	101
Abb. 67: Reaktion des Aldehydnachweisreagenz Purpald mit Aldehyden ; Quelle: Sigma Aldrich - Technical Bulletin Purpald®	107
Abb. 68: Substratstufenphosphorylierung bei der Dismutation von 1,2-PDO zu Propionsäure und Propanol bei <i>L. reuteri</i> DSM 20016 ; nach Sriramulu et al. (2008)	108

TABELLENVERZEICHNIS

Tab. 1: Eigenschaften von 3-Hydroxypropionaldehyd (MSDS)	2
Tab. 2: Eigenschaften der Glycerindehydratase	6
Tab. 3: Übersicht glycerinverwertender Bakterien (Auswahl); grau unterlegt - nur reduktive Glycerinverwertung, (*) B ₁₂ -unabhängige GDHt	7
Tab. 4: Biotechnische Produktion von 3HPA als Endprodukt; (Auswahl)	12
Tab. 5: Vergleich der Harnstoffderivate Carbohydrazid und Semicarbazid mit Harnstoff	14
Tab. 6: Geräteliste des Doppelfermentersystems	19
Tab. 7: Zusammensetzung des MRS-Mediums	22
Tab. 8: Zusammensetzung der Supplinelösungen für die Optimierung der Zellanzucht im Fed-Batch	25
Tab. 9: Geräteliste des 15-L-Fermenterstands BiostatE[®]	26
Tab. 10: Zusammensetzung der Feedlösungen für die Zellanzucht im Fed-Batch	28
Tab. 11: Geräteliste des verwendeten HPLC-Systems	32
Tab. 12: Alternative Substrate für die Biotransformation mit <i>L. reuteri</i>; (+) Abbau erfolgt, (-) kein Abbau	73
Tab. 13: Pipettierschema der einzelnen Ansätze für den colorimetrischen Test	88
Tab. 14: Übersicht der Literaturangaben über die Biomasseproduktion von <i>L. reuteri</i> mit MRS-Medium (* approximiert).....	91
Tab. 15: Biotransformation von Glycerin zu 3HPA mit <i>K. pneumoniae</i> und Fängerstoffeinsatz; Vergleich der Konzentrationen von Glycerin und Semicarbazid	99
Tab. 16: Literaturvergleich bezüglich Sauerstoffeinfluss bei getrennter Zellanzucht und Biotransformation	103
Tab. 17: Übersicht möglicher alternativer 3HPA-Fängerstoffe	109

GLEICHUNGSVERZEICHNIS

Gleichung 1: Zusammenhang zwischen der Säure- und Basenkonstante.....	35
Gleichung 2: Reaktionsschema zur (a) enzymatischen Dehydratisierung von Glycerin zu 3HPA und dessen Detoxifizierung durch Carbazonbildung mit Carbohydrazid zum (b) N-mono- und (c) N,N-di- (3-Hydroxypropylaldehyd)-Carbohydrazon.....	94
Gleichung 3: Gleichgewichtsreaktionen zwischen (a) 3HPA und Carbohydrazid mit dessen Carbazon, (b) 3HPA und Acrolein, (c) Acrolein und Carbohydrazid mit dessen Carbazon	112

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

Abkürzung	Bezeichnung
1,2-PDO	1,2-Propandiol
1,3-PDO	1,3-Propandiol
3HP	3-Hydroxypropionsäure
3HPA	3-Hydroxypropionaldehyd
B ₁₂	Vitamin B ₁₂
BTM	Biotrockenmasse
CoA	Koenzym A
D ₂ O	Deuteriumoxid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNPH	2,4-Dinitrophenylhydrazin
EC	Enzyme Commission Number
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
GDA	Glutardialdehyd
GDHt	Glycerindehydratase
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
<i>K. pneumoniae</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
KOH	Kaliumhydroxid
KPP	Kaliumphosphat Puffer
<i>L. reuteri</i>	<i>Lactobacillus reuteri</i>
MBTH	3-Methyl-2-benzthiazolinon Hydrazon
MRS	Medium für <i>Lactobacillaceae</i> nach De Man, Rogosa und Sharpe
MSDS	Material Safety Data Sheets (Sicherheitsdatenblätter)
NAD ⁺	Nicotinamidadenindinukleotid (oxidiert)
NADH	Nicotinamidadenindinukleotid (reduziert)
OD ₆₀₀	Optische Dichte bei Wellenlänge von 600 nm
pK _B	negativ dekadischer Logarithmus der Basenkonstante
PVA	Polyvinylalkohol
RID	Refraktionsindexdetektor
UVD	UV-Detektor

1. Einleitung & Zielsetzung

1.1 Biotechnische Nutzung von Glycerin als Alternative zur Petrochemie

Aufgrund der sinkenden Erdölverfügbarkeit und der steigenden Energiekosten (Willke und Vorlop, 2004) werden alternative Herstellungswege in der Petrochemie gesucht. Darüber hinaus rückt durch den unentwegt steigenden Erdölpreis (UK-Brent, Abb. 1 A) von 1987 mit 18,6 \$ über 2008 mit 143,95 \$ und aktuell 110 \$ (Jan 2012) die Nutzung nachwachsender Rohstoffe immer mehr in den Fokus aktueller Forschungsvorhaben und industrieller Umsetzungen, um die stetig wachsende Nachfrage für Chemikalien und Konsumgüter zu decken. Als populäres Beispiel hierfür gilt die Herstellung von Biodiesel aus nachwachsenden Rohstoffen. Bei der Herstellung findet eine Umesterung (z.B. in Europa von Rapsöl) mit Methanol statt, wobei ca. 10 % Glycerin als Nebenprodukt anfallen (Willke und Vorlop, 2008). Seitdem erfährt dieser Rohstoff aufgrund des weltweit steigenden Angebotes einen Preisverfall (Abb. 1 B) und macht ihn für biotechnologische Anwendungen attraktiv, da hierbei die Rohstoffpreise den Hauptkostenfaktor darstellen (Willke und Vorlop, 2004). Glycerin kann unter anderem für die biotechnische Herstellung von 1,3-Propandiol (1,3-PDO), Zitronensäure, Ethanol, Milchsäure und Bernsteinsäure verwendet werden (Dobson et al., 2012). Eine weitere Möglichkeit besteht in der Herstellung von 3-Hydroxypropionaldehyd (Vollenweider und Lacroix, 2004).

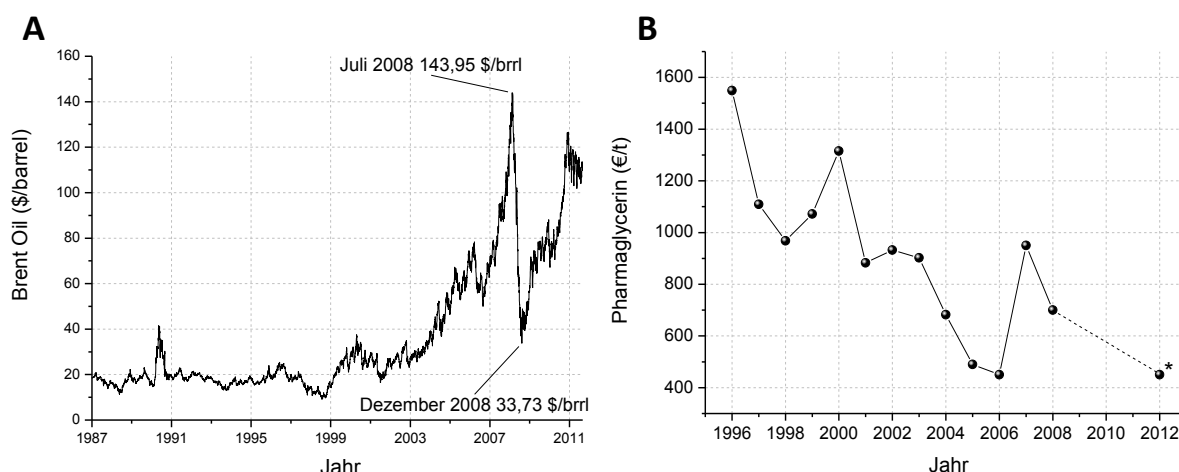


Abb. 1: **Rohstoffpreisentwicklung**; (A) Erdöl-Brent Oil (Quelle: U.S. Energy Information Administration) und (B) Pharmaglycerin (Quelle: Oleofine, (*) Quelle: ICISpricing.com 20.01.2012)

Die Herstellung chemischer Verbindungen über einen biotechnischen Prozess haben meist Vorteile gegenüber einem chemischen Prozess (Willke und Vorlop, 2004). Vor allem die Reaktionsbedingungen unter milden Temperaturen und Normaldruck machen biologische Systeme neben einer hohen Regio- und Stereospezifität sehr attraktiv. Dadurch rückt aus Glycerin in einem biotechnischen Prozess hergestelltes 3HPA in den Fokus der wissenschaftlichen Forschung bzw. des industriellen Interesses.

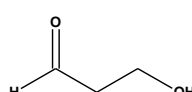
1.2 3-Hydroxypropionaldehyd als universeller Grundbaustein

Die Entdeckung von 3-Hydroxypropionaldehyd (3HPA) erfolgte auf Umwegen über die wertmindernde Acroleinbildung bei der Weinherstellung. Bereits aus dem 19. Jahrhundert existieren Belege von Louis Pasteur (1866), der die Entwicklung eines bitteren Beigeschmacks bei der Weinherstellung untersuchte. Anfang des 20. Jahrhunderts wurde dies auf die Bildung von Acrolein zurückgeführt (Voisenet, 1910; Voisenet und Gautier, 1910) und wenig später erkannt, dass dies aus einem biologischen Abbau von Glycerin herrührt

(Voisenet, 1914; Voisenet und Gautier, 1914a; Voisenet und Gautier, 1914b). Bemerkenswert hierbei ist, dass bereits zu diesem frühen Zeitpunkt aufgrund eines unspezifischen Farbtestes die Beteiligung von 3HPA (Aldéhyde hydracrylique) als Zwischenprodukt vermutet, jedoch das auftretende 1,3-PDO nicht einer enzymatischen sondern fälschlicherweise einer rein chemischen Umsetzung zugeschrieben wurde. Reynolds et al. (1939) vermutete Acrolein als Endprodukt des Glycerinabbaus. Dies konnte in weiterführenden Untersuchungen jedoch nicht bestätigt werden, sodass lediglich eine Nebenreaktion angenommen wurde (Mickelson und Werkman, 1940). Von weiteren Autoren (Serjak et al., 1954; Mills et al., 1954) konnten neben anderen Bakterien auch Lactobacillen für die Acroleinbildung in Brennerreimische identifiziert und durch Sobolov und Smiley (1960) der Abbau von Glycerin über 3HPA zu 1,3-PDO und 3-Hydroxypropionsäure (3HP) beschrieben werden. Dass 3HPA das Intermediat ist, wurde aufgrund der äquimolaren Bildung von 1,3-PDO und 3HP und einer vermuteten Dismutation geschlussfolgert. Erst durch Abeles et al. (1960) gelang die Identifizierung von 3HPA als Zwischenprodukt mittels Semicarbazid und 2,4-Dinitrophenylhydrazin.

Auch aktuell ist die Bildung von Acrolein aus 3HPA aufgrund des bitteren Geschmacks problematisch für die Weinherstellung (Bauer et al., 2010a; Bauer et al., 2010b). Die Grundlage für das Interesse der chemischen Industrie an 3HPA bzw. Acrolein wurde durch Hall und Stern (1950) gelegt, währenddessen die Anwendung als Biozid durch eine Vielzahl an Autoren in ersten Versuchen erkannt wurde (Talarico und Dobrogosz, 1989; Axelsson et al., 1989; Chung et al., 1989). Der reaktive Aldehyd 3HPA ist eine farblose, viskose Flüssigkeit (Rütti, 2010), dessen wichtigste Eigenschaften in Tab. 1 dargestellt sind.

Tab. 1: Eigenschaften von 3-Hydroxypropionaldehyd (MSDS)

Eigenschaft	
Synonyme	Hydracrylaldehyde, 3-Hydroxypropanal, 3-Oxo-1-propanol, Hydracrolein, Reuterin, β -Hydroxypropanal, β -Hydroxypropionaldehyde
Formel	$C_3H_6O_2$ 
Cas Nummer	2134-29-4 bzw. 118606-97-6
Molekulargewicht	74,08 g/mol
Dichte	1,016 g/cm ³
Siedepunkt	168,2°C (1013,25 hPa) 40°C (26,7 Pa)
Flammpunkt	61,8°C
Dampfdruck	72.0 Pa (25°C, berechnet)
Refraktionsindex	1,4

Bereits Hall und Stern (1950) beobachteten, dass 3HPA in wässrigen Systemen als Dimer auftritt und unter hohen Temperaturen und/oder sauren Bedingungen eine Acroleinbildung stattfindet. Untersuchungen in biologischen Systemen durch Talarico und Dobrogosz (1989) zeigten ein 3-Komponentensystem, dass durch Arntz et al. (1991) und Vollenweider et al. (2003) bestätigt wurde (Abb. 2 A). Weiterhin konnte eine dynamische Umverteilung der Komponenten in Abhängigkeit von der Konzentration aufgedeckt werden (Abb. 2 B).

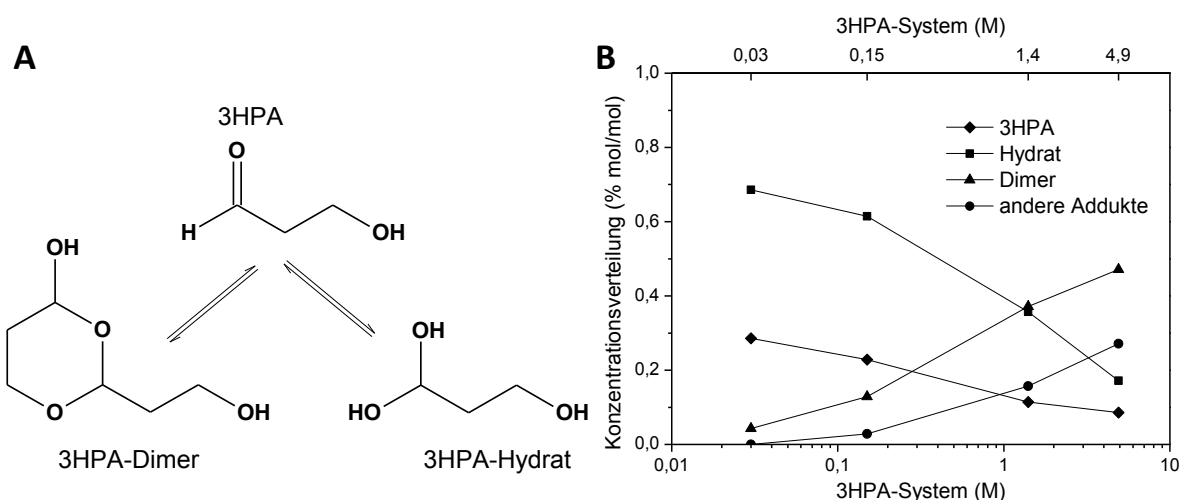


Abb. 2: **Dynamisches 3HPA-System**; Verteilung des Monomers, Dimers und des Hydrats nach (A) Talarico und Dobrogosz (1989) und (B) die Erweiterung in Abhängigkeit von der Konzentration nach Vollenweider et al. (2003) in D₂O bei 20°C

Dieses Stoffgemisch aus 3HPA-Monomer, Hydrat und Dimer, auch als Reuterin bezeichnet, ist vor allem in den Focus medizinischer Untersuchungen gelangt. Es könnte zur Konservierung von Nahrungsmitteln (Mohamadi Sani et al., 2005; Kuleasan und Cakmakci, 2002; El-Ziney et al., 1999; El-Ziney und Debevere, 1998) oder Kosmetika (Vollenweider und Lacroix, 2004) dienen, jedoch ist dies aufgrund des unter Hitzeeinwirkung entstehenden Acroleins bedenklich (Vollenweider und Lacroix, 2004). Des Weiteren könnte 3HPA als Ersatz von Glutardialdehyd bei der Desinfektion (El-Ziney und Jakobsen, 2009; Liang et al., 2003) oder der Gewebefixierung von Bioprothesen verwendet werden, da es eine deutlich geringere Entzündungsreaktion und eine geringere Verkalkung verursacht (Sung et al., 2003; Chen et al., 2002; Sung et al., 2002). 3HPA zeigt in Abhängigkeit vom pH-Wert eine Vielzahl an 3HPA-Oligomeren (Sung et al., 2003), die ein ähnlich komplexes Polymerisierungspotential besitzen wie Glutardialdehyd (Migneault et al., 2004). Als biologisch aktive Substanz wurde entgegen früherer Aussagen nicht das Dimer (Dobrogosz und Lindgren, 1988), sondern das 3HPA-Monomer identifiziert (Vollenweider et al., 2010; Vollenweider et al., 2003). Die biozide Wirkung wurde bereits an einer Vielzahl von Mikroorganismen, unter anderem an *Lactobacillus spp.*, *Bacillus spp.*, *Bifidobacterium spp.*, *Enterococcus spp.*, *Clostridium spp.*, *Staphylococcus aureus* und *Listeria spp.* (Jamalifar et al., 2011; Rasch et al., 2007; Cleusix et al., 2007; Arques et al., 2004; Rasch, 2002; Gänzle et al., 2000), aber auch für *Trypanosoma brucei brucei* (Yunmbam und Roberts, 1993; Yunmbam und Roberts, 1992) gezeigt. Aufgrund dieser Eigenschaft werden bereits kommerzielle Produkte mit *L. reuteri* als probiotische Nahrungsmittel angeboten (Casas und Dobrogosz, 2000) und diese Wirkung auch in aktuellen Studien belegt (Jensen et al., 2012; Keller et al., 2012; Wanke und Szajewska, 2012).

Für die chemische Industrie ist 3HPA als eine mannigfaltig einsetzbare Chemikalie von sehr großem Interesse und kann in eine Vielzahl von Plattformchemikalien wie z.B. Acrolein, Acrylsäure, Acrylamid, 3HP und 1,3-PDO umgewandelt werden (Vollenweider und Lacroix, 2004). Dabei kann z.B. Acrylsäure als Grundbaustein zur Herstellung von Superabsorbent (Polyacrylsäure) oder zur Herstellung von Hochleistungspolymeren (Acrylsäuremethylester) dienen (Schaffer et al., 2008). Zudem kann 1,3-PDO zusammen mit Terephthalsäure zur Herstellung des Kunststoffes Polytrimethylenterephthalat (PTT) verwendet werden, das bereits als Sorona™ (Du Pont/Genencor) bzw. Corterra™ (Shell) erhältlich ist. 3HP kann

sowohl für die Herstellung von bioabbaubaren Kunststoffen verwendet, als auch zu Malonsäure oxidiert werden und ist in der pharmazeutischen Chemie von großem Interesse (Fuchs et al., 2007). Aufgrund der bereits bestehenden petrochemischen Herstellungsverfahren könnte 3HPA aus nachwachsenden Rohstoffen und dessen Folgeprodukte direkt in bestehende Produktionswege eingeschleust werden. Bereits in Vollenweider und Lacroix (2004) wurde unter anderem ausführlich über die Nutzung und Perspektiven von 3HPA berichtet (Abb. 3).

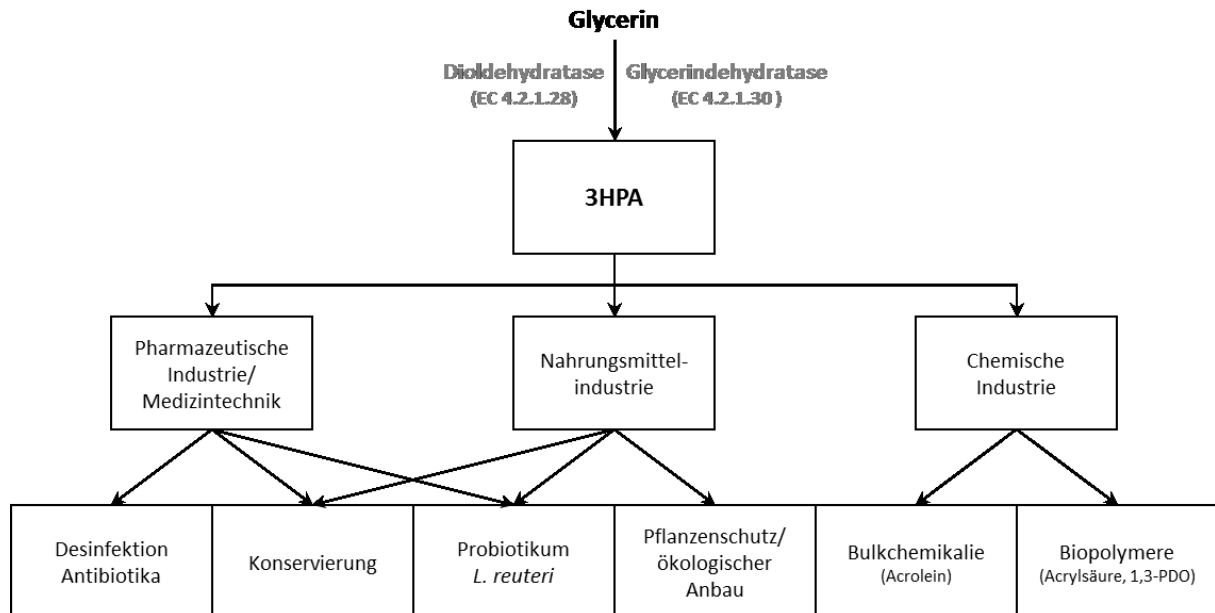
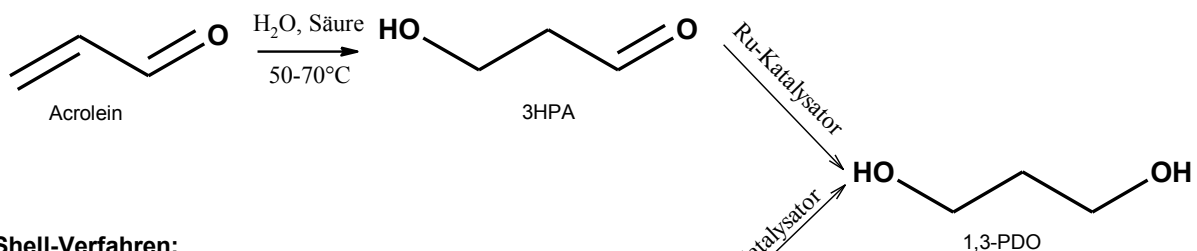


Abb. 3: Übersicht der Anwendungsgebiete für 3HPA; verändert nach Vollenweider und Lacroix (2004)

1.3 Petrochemische Herstellung von 3HPA

Petrochemisch hergestelltes 3HPA tritt als Zwischenprodukt bei der Herstellung von 1,3-PDO auf (Abb. 4). Die angewandten Verfahren hierfür sind von Degussa (Arntz und Wiegand, 1991) und Shell patentiert (Powell et al., 1996). Diese Verfahren arbeiten bei hohen Drücken, Temperaturen und mit preisintensiven Katalysatoren. Dadurch ist die Produktion mit hohen Energie- und Materialkosten verbunden.

Degussa/DuPont-Verfahren:



Shell-Verfahren:

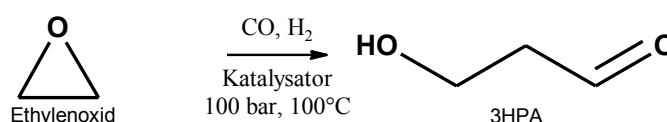


Abb. 4: Verfahren zur Herstellung von 1,3-PDO mit 3HPA als Zwischenprodukt; erweitert nach Steverding (2010)

Die 3HPA-Herstellung im Evonik/DuPont-Verfahren beruht auf der Herstellung von Acrolein aus Propylen. Das entstehende Acrolein wird dabei nach Hall und Stern (1950) zu 3HPA

hydratisiert und schließlich über einen Ruthenium-Katalysator unter hohem Druck zu 1,3-PDO hydriert. Obwohl dieses Verfahren gegenüber dem Shell-Verfahren geringere Rohstoff- und Energiekosten aufweist, ist demgegenüber die Selektivität gering. Unter anderem entsteht neben 1,3-PDO auch 1,2-Propandiol. Außerdem wird nur 65 % des Acroleins in 1,3-PDO umgesetzt (Ulmer, 2008).

Im Shell-Verfahren wird aus Ethylenoxid und Synthesegas über einen Cobaltkatalysator 3HPA hergestellt und über einen Raney-Nickel-Katalysator zu 1,3-PDO hydriert. In diesem Verfahren stehen hohen Rohstoff- und Energiekosten eine hohe Selektivität und ein gutes Katalysatorrecycling gegenüber (Ulmer, 2008).

1.4 Biologische Herstellung von 3HPA

1.4.1 Eigenschaften der Glycerindehydratase und deren Reaktionsmechanismus

Die Dehydratation von Glycerin zu 3HPA wird durch die GDHt (EC 4.2.1.30) katalysiert, die Vitamin B₁₂ als Koenzym enthält (Smiley und Sobolov, 1962; Abeles und Lee, 1961) und hauptsächlich aus *L. reuteri*, *K. pneumoniae* und *Citrobacter freundii* isoliert und charakterisiert wurde (Talarico und Dobrogosz, 1990; Forage und Foster, 1979; Johnson et al., 1975; Schneider und Pawelkiewicz, 1966). Zusätzlich kann von der GDHt auch 1,2-Propandiol (1,2-PDO) und 1,2-Ethandiol (1,2-EtOH) als Substrat verwertet werden und analog zu Glycerin als Substrat unter Dehydratisierung die entsprechenden Aldehyde Propanal und Acetaldehyd bilden. Die reduktive Verwertung von Glycerin ist in Abb. 5 dargestellt und eine Auswahl der Eigenschaften der GDHt in Tab. 2 zusammengefasst.

Tab. 2: Eigenschaften der Glycerindehydratase

Eigenschaft	Wert	Bakterium	Referenz
pH-Optimum	5,8 – 7,2	<i>Lactobacillus reuteri</i>	Talarico und Dobrogosz (1990), Smiley und Sobolov (1962)
	8 – 8,6	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Johnson et al. (1975), Smiley und Sobolov (1962)
	8,5	<i>Citrobacter freundii</i>	Qi et al. (2006)
Temperatur- optimum	Nicht bestimmt	<i>Lactobacillus reuteri</i>	-
	37°C	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Seifert et al. (2001)
	37°C	<i>Citrobacter freundii</i>	Wang et al. (2007)
Inhibitoren	CN ⁻ , Na ⁺ , Hydroxo- und Cyanocobalamin	<i>Lactobacillus reuteri</i>	Smiley und Sobolov (1962)
	Ag ⁺ , EDTA, Hg ²⁺ , p-Chloromercuribenzoat	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Schneider et al. (1970)
	O ₂	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Kajiura et al. (2007)
	Glycerin	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Honda et al. (1980)
Aktivatoren	NH ₄ ⁺ , Rb ⁺ , K ⁺ ,	<i>Klebsiella pneumoniae</i> <i>Lactobacillus reuteri</i>	Daniel et al. (1998)
K _m -Wert Glycerin (mM)	0,53 – 1,5	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Yamanishi et al. (2002), Honda et al. (1980)
	3,3	<i>Lactobacillus reuteri</i>	Talarico und Dobrogosz (1990)
K _m -Wert 1,2-PDO (mM)	2·10 ⁻⁵ – 1,2	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Wang et al. (2007), Forage und Foster (1979)
	7	<i>Lactobacillus reuteri</i>	Talarico und Dobrogosz (1990)
K _m -Wert 1,2-EtOH (mM)	1,08 - 1,56	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Honda et al. (1980)

In ersten Arbeiten wurde das Vorhandensein von Kalium als essentiell für die Aktivität der GDHt beschrieben (Smiley und Sobolov, 1962). Neuere Arbeiten weisen zusätzlich aufgrund der Anfälligkeit gegenüber EDTA (Schneider et al., 1970) auf ein zweiwertiges Metallion hin, das bei *K. pneumoniae* als Kalzium identifiziert wurde (Toraya et al., 2010). Des Weiteren sollte aufgrund der Hemmung durch Natrium (Smiley und Sobolov, 1962) auf dieses im Reaktionsansatz verzichtet werden.

Die Umsetzung von Glycerin zu 3HPA beruht auf einem Radikalmechanismus. Hierbei wird substratinduziert eine homolytische Spaltung der Co-C-Bindung des B₁₂ Koenzyms verwendet, um in einem ersten Schritt ein Kobalt- und ein Adenosylradikal zu bilden. Letzteres wird für eine Reorganisation des Glycerins verwendet. Dabei wird die OH-Gruppe vom C-2- auf das C-3-Atom übertragen und Wasser abgespalten. Aufgrund der Bildung von hochreaktiven Radikalen kann es zu einer Vielzahl an unerwünschten Nebenreaktionen kommen, die letztendlich eine irreversible Inaktivierung der GDHt zur Folge haben. Bei *K. pneumoniae* wurde sowohl für die Glycerin- als auch für die ähnliche Dioldehydratase eine Reaktivase entdeckt, kloniert und charakterisiert, die in der Lage ist, das inaktivierte Koenzym B₁₂ der GDHt mittels Mg²⁺ und ATP auszutauschen und damit das Enzym zu reaktivieren. Der Reaktions- und Reaktivierungsmechanismus ist detailliert von Toraya (2003; 2000) zusammengefasst.

1.4.2 Verbreitung des Glycerinabbaus

Eine Vielzahl von Bakterien ist in der Lage, Glycerin oxidativ und reduktiv als einzige Kohlenstoffquelle zu verwerten (Lin, 1976) und eine Auswahl in Tab. 3 zusammengefasst. Wobei der weit verbreiteten Verwendung von Glycerin als einzige Kohlenstoffquelle nur wenige beschriebene Bakterien gegenüber stehen, die Glycerin einzig in einem reduktiven Abbau nutzen (Tab. 3, grau unterlegt). Bei der oxidativen Nutzung wird Glycerin über Glycerin-3-Phosphat (Glycerinkinase, EC 2.7.1.30) oder über Dihydroxyaceton (Glycerindehydrogenase, EC 1.1.1.6) als Glycerinaldehyd-3-Phosphat in den Energie- und Baustoffwechsel der Zelle eingeschleust (Abb. 5). Daraus werden die typischen, für die Energiegewinnung oxidierten (z.B. Acetat, Formiat) oder, um den Reduktionsäquivalentepool (NAD^+/NADH) aufrecht zu erhalten, reduzierten (z.B. Ethanol, 2,3-Butandiol) Endprodukte gebildet (Zeng et al., 1996; Streekstra et al., 1987). Bei der ausschließlichen reduktiven Nutzung hingegen wird Glycerin durch die GDHt zu 3HPA dehydratisiert und anschließend zur Regenerierung der Reduktionsäquivalenteakzeptoren (NAD^+) durch die 1,3-Propandioloxidoreduktase (EC 1.1.1.202) zu 1,3-PDO reduziert. Dabei tritt unter Wachstumsbedingungen freies 3HPA nur bei wenigen Bakterien in messbaren Konzentrationen auf, sodass bisher nur 6 Gattungen bekannt sind: *Bacillus* (Voisenet, 1914), *Lactobacillus* (Mills et al., 1954; Serjak et al., 1954), *Enterobacter* (Barbirato et al., 1996), *Klebsiella* (Slininger et al., 1983; Abeles et al., 1960; Reynolds et al., 1939), *Citrobacter* (Mickelson und Werkman, 1940) und *Clostridium* (Humphreys, 1924).

Tab. 3: Übersicht glycerinverwertender Bakterien (Auswahl); grau unterlegt - nur reduktive Glycerinverwertung, (*) B₁₂-unabhängige GDHt

Systematik	Art	Referenz
Bacteria/ Firmicutes/ Bacilli/ Lactobacillales	<i>Lactobacillus brevis</i> <i>Lactobacillus buchneri</i> <i>Lactobacillus collinoides</i> <i>Lactobacillus reuteri</i> <i>Lactobacillus hilgardii</i>	Schütz und Radler (1984) Schütz und Radler (1984) Sauvageot et al. (2000) Axelsson et al. (1989)
<i>Lactobacillaceae</i>	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	Pasteris und Strasser de Saad (2009) Pinto et al. (2004)
Bacteria/ Firmicutes/ Clostridia/ Clostridiales	<i>Clostridium butyricum</i> * <i>Clostridium pasteurianum</i> <i>Clostridium acetobutyricum</i> <i>Clostridium beijerinckii</i> <i>Caloramator viterbensis</i>	O'Brien et al. (2004), Forsberg (1987) Nakas et al. (1983) Forsberg (1987) Forsberg (1987) Seyfried et al. (2002)
<i>Clostridiaceae</i>		
Bacteria/ Proteobacteria/ γ-Proteobacteria/ Entero- bacteriales	<i>Escherichia blattae</i> <i>Citrobacter freundii</i> <i>Citrobacter intermedius</i> <i>Klebsiella pneumoniae</i> <i>Klebsiella oxytoca</i> <i>Pantoea agglomerans</i>	Andres et al. (2004) Toraya et al. (1980) Toraya et al. (1980) Forage und Foster (1982) Toraya (2000) Barbirato et al. (1995)
<i>Enterobacteriaceae</i>		

Sowohl aus *L. reuteri* (Sriramulu et al., 2008; Lee und Abeles, 1963), *Citrobacter freundii* (Toraya und Fukui, 1982) als auch *K. pneumoniae* (Toraya et al., 1971) konnte ein weiteres Enzym isoliert werden. Die Dioldehydratase (EC 4.2.1.28) katalysiert ebenfalls die Dehydratisierung von Glycerin zu 3HPA, jedoch mit einer deutlich geringeren Affinität zu Glycerin und 1,2-EtOH, da das Hauptsubstrat 1,2-PDO ist. Trotz ihrer Ähnlichkeit konnten beide Enzyme distinkt voneinander immunochemisch unterschieden werden (Toraya und Fukui, 1977). Dieses durch 1,2-PDO induzierbare Enzym wird bei *L. reuteri* mit Glucose und Glycerin als Substrat nur minimal exprimiert (Sriramulu et al., 2008) und wird in dieser Arbeit nicht weiter betrachtet.

1.4.3 *Lactobacillaceae* – *Lactobacillus reuteri*

Für einige Lactobacillen konnte gezeigt werden, dass sie Glycerin ausschließlich reduktiv nur in Verbindung mit einem Wachstumssubstrat verwerten können (Tab. 3, grau unterlegt). Diese besondere Eigenschaft macht sie für die biotechnische Herstellung von 3HPA im Gegensatz zu z.B. *K. pneumoniae* sehr interessant, da hierbei theoretisch 100% des Glycerins verwendet wird und keine Nebenprodukte erwartet werden.

Lactobacillen werden aufgrund ihres Metabolismus in homo- und heterofermentative Milchsäurebakterien unterschieden. Letztere produzieren neben Milchsäure auch Nebenprodukte wie z.B. Acetat und Ethanol. Lactobacillen sind grampositive, unbewegliche, nichtsporulierende, säuretolerante, anaerobe bzw. aerotolerante Kokken bzw. Stäbchen. Obwohl aerotolerante Arten in der Lage sind in Anwesenheit von Sauerstoff zu wachsen, fehlen ihnen typische Entfernungsmechanismen wie Katalase oder Cytochrome (Axelsson, 1998), wodurch inhibitorische Konzentrationen von Wasserstoffperoxid entstehen können (Condon, 1987). Dennoch wurden NADH-Oxidasen gefunden, die in Verbindung mit NADH-Peroxidasen Sauerstoff bzw. entstehenden Wasserstoffperoxid unter Verwendung von Reduktionsäquivalenten abbauen können (Gaudu et al., 2002; Higuchi et al., 2000; Axelsson, 1998).

Lactobacillen sind an nährstoffreiche Habitate angepasst und wurden in Milch, Pflanzenmaterial und dem Verdauungstrakt von Säugetieren nachgewiesen (Schleifer und Ludwig, 1995; Schlegel, 1992). Dadurch ging eine Vielzahl an Genmaterial und somit auch die Stoffwechselvielfalt verloren, wohingegen Stoffaufnahmesysteme (Transporter) vervielfacht wurden (Makarova et al., 2006). Viele Lactobacillen sind in der Lage, Vitamin B₁₂, das neben Riboflavin und Folsäure bei Nahrungsmitteln durch Fermentation die Qualität erhöht, de novo zu synthetisieren. Vor allem Arten der Gattung *Lactobacillus* spielen unter anderem durch die Bildung von Milchsäure und Bakteriocinen (Hansen, 2002; Axelsson, 1998) und deren probiotische Wirkung in Nahrungsmitteln eine wichtige Rolle im Verdauungstrakt von Säugetieren (Roos und Jonsson, 2002; Reuter, 2001). Aufgrund der Nahrungsmittelproduktion sind viele Lactobacillen inklusive *L. reuteri* als generell sicher (GRAS - generally recognized as safe) eingestuft. *L. reuteri* findet bereits u.a. bei Maldigestion oder Malabsorption wie z.B. Säuglingskoliken Anwendung (BiGaia®, InfectoPharm GmbH, Heppenheim, Dtl.)

Lactobacillus reuteri, als *L. fermentum* Biotyp II isoliert (Lerche und Reuter, 1962) und zu *L. reuteri* umklassifiziert (Kandler et al., 1980; Kandler und Stetter, 1973) ist ein aerotolerantes, heterofermentatives, unbewegliches Stäbchen (0,7-1 µm x 2-5 µm) das in Paaren oder Clustern auftritt. Das Hauptabbauprodukt des glykolytischen Wachstums von *L. reuteri* auf Glucose ist Lactat (Abb. 5). Neben Glucose können auch Fructose, Arabinose, Ribose, Saccharose, Laktose, Maltose, Melobiose, Raffinose und Gluconsäure verwertet werden (Kandler et al., 1980), wobei nach Årsköld et al. (2008) der Pentosephosphatweg gegenüber der Glykolyse dominiert (Abb. 5). Das optimale Wachstum erfolgt bei 35-38°C bei einem Anfangs-pH-Wert von 6,0-6,8 (Kandler et al., 1980).

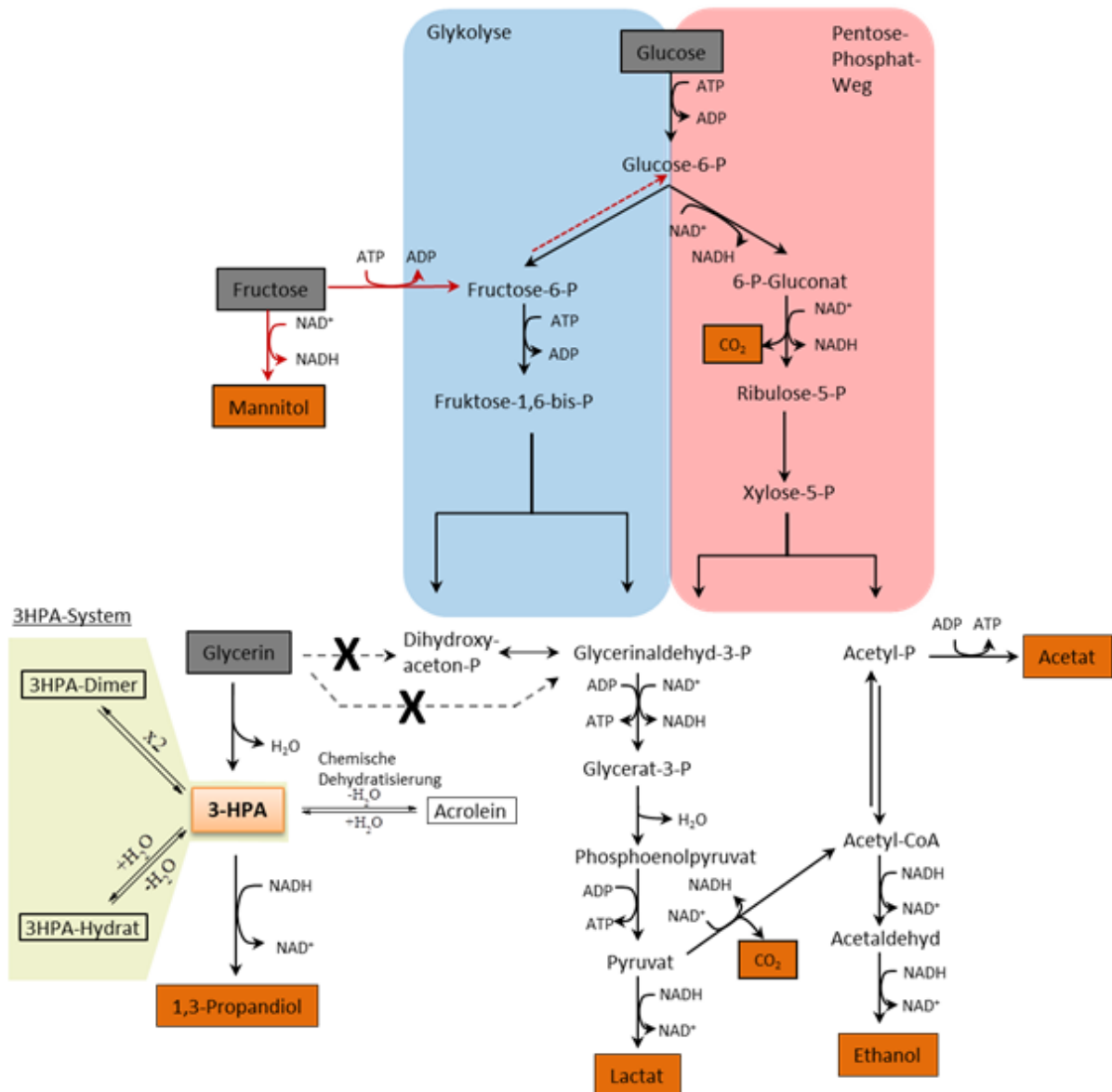


Abb. 5: **Getrennter Stoffwechselweg von Glucose und Glycerin bei *L. reuteri* mit 3HPA-System**; Vereinfachte Darstellung der Glykolyse und des Pentosephosphatwegs, zusätzlich Verwertung von Fructose, ■ = Substrat, ■ = Endprodukt, P = Phosphat

Das für die Funktion der GDHt benötigte Koenzym B₁₂ (Pseudo-B₁₂) kann von *L. reuteri* de-novo synthetisiert werden (Santos et al., 2007). Die benötigten Gene (29 ORFs) befinden sich in einem einzigen Cluster auf dem bakteriellen Chromosom (Santos et al., 2011; 2008). In diesem Cluster befinden sich ebenfalls die Gene für den reduktiven Glycerinabbau, wobei jedoch keine Proteine kodiert werden, die Glycerin oxidativ nutzen können (Santos et al., 2011; 2008). Sequenzierungen zeigen starke Ähnlichkeiten zu den Gattungen *Salmonella* und *Listeria* der γ -Proteobakterien (Santos et al., 2011; Morita et al., 2008; Santos et al., 2008) und legen die Schlussfolgerung eines horizontalen Gentransfers nahe. Eine weitere Besonderheit offenbart sich in der Synthese des Koenzym-B₁₂ unter anaeroben Bedingungen, da hier als α -Ligand nicht Dimethylbenzimidazol sondern 5'-Deoxyadenosin verwendet wird (Santos et al., 2007). Dieses Pseudovitamin B₁₂ (Abb. 6) wurde bereits für *Salmonella enterica* beschrieben (Taga und Walker, 2008).

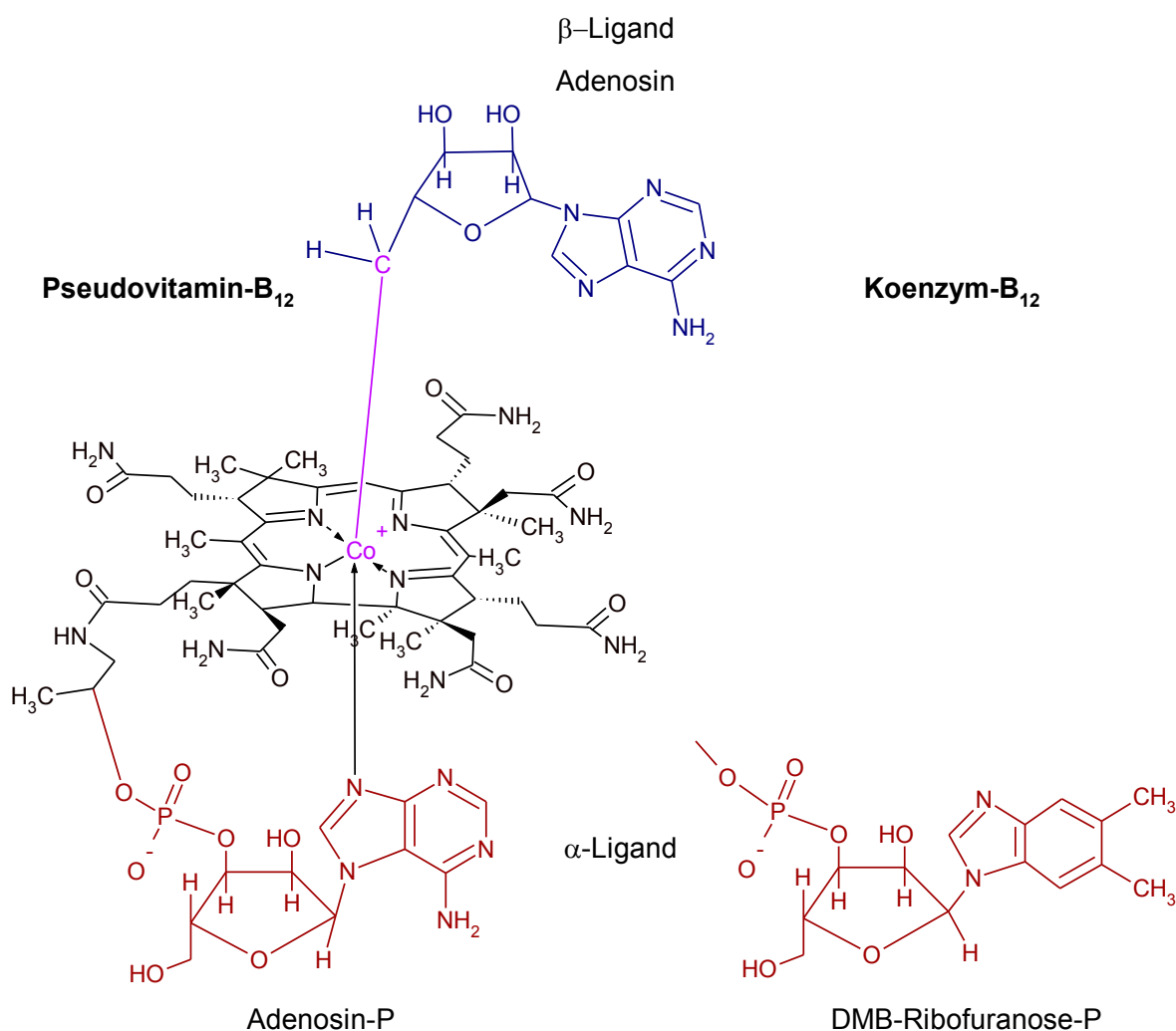


Abb. 6: **Struktur des Pseudovitamin-B₁₂ im Vergleich zum Koenzym-B₁₂**; Radikalbildung zwischen dem Cobaltatom und dem α-Ligand, DMB = Dimethylbenzimidazol, P=Phosphat

Bei *L. reuteri* wurde frühzeitig eine überdurchschnittliche Akkumulation von 3HPA erkannt (Sobolov und Smiley, 1960). Darüber hinaus kann Glycerin nicht in den oxidativen Stoffwechsel eingeschleust werden (Abb. 5) und dient deshalb nur als Reduktionsäquivalenteakzeptor (Sauvageot et al., 2000; Talarico et al., 1990; Talarico et al., 1988; Schütz und Radler, 1984). Dies macht *L. reuteri* sehr interessant für die biotechnische Herstellung von 3HPA.

1.5 Biotechnische Herstellung von 3HPA

Vor allem für pharmazeutische Anwendungen ist es von Interesse, Reuterin als Reinstoff zu erhalten. In ersten Biotransformationsversuchen mit aufgereinigter GDHt aus *L. reuteri* und *K. pneumoniae* zeigte sich eine schnelle Inaktivierung des Enzyms (Slininger et al., 1983; Poznanskaya et al., 1977). Nachfolgende Zellsuspensionsversuche zur Herstellung von 3HPA, bei denen auf Glucose/Glycerin-MRS-Medium gewachsene *L. reuteri* Zellen in einem 2-stufigen Prozess verwendet wurden, führten ebenfalls zu einer Inaktivierung der GDHt und zum Reaktionsstillstand (Talarico und Dobrogosz, 1989; Talarico et al., 1988). Auch die detaillierte Neubeschreibung dieses 2-Stufen-Systems brachte das gleiche Ergebnis (Doleyres et al., 2005; Lüthi-Peng et al., 2002a). In einer optimierten Biotransformation konnte jedoch bei niedrigen Temperaturen (30°C) 235 mM freies 3HPA hergestellt werden (Doleyres et al., 2005) und durch eine weitere Temperaturerniedrigung auf 5-15°C sowohl die Toxizität von

3HPA verringert als auch die Überlebensrate der Bakterienzellen erhöht werden. Dessen ungeachtet erfolgte auch hierbei eine Inaktivierung der GDHt. In anderen Ansätzen wurde, um den Regenerationsmechanismus des B₁₂-Koenzyms zu unterstützen (Kajiura et al., 2007; Kajiura et al., 2001; Toraya, 2000; Tobimatsu et al., 2000; Tobimatsu et al., 1999; Mori et al., 1997a; Mori et al., 1997b; Honda et al., 1980), Glucose als Kosubstrat untersucht (Tobajas et al., 2008; Rasch et al., 2002; Lüthi-Peng et al., 2002b; El-Ziney et al., 1998). Es zeigte sich bei einem Glucoseverhältnis von höchstens 0,33 zu Glycerin eine maximale 3HPA-Produktion bei 37°C (Lüthi-Peng et al., 2002b). Durch die Bildung von Reduktionsäquivalenten wurde allerdings 3HPA im weiteren Verlauf zu 1,3-PDO reduziert. Somit ist in diesen Ansätzen der Erntezeitpunkt entscheidend, um eine weitere Reduktion zu vermeiden (Lüthi-Peng et al., 2002b). Bei einer genetischen Modifizierung von *Escherichia blattae*, der ein natürlicher B₁₂-Produzent ist, konnte das dha-Regulon überexprimiert und eine funktionsfähige GDHt exprimiert werden (Schaffer et al., 2008). Aber auch durch diese genetische Modifikation verhinderte nicht die Inaktivierung der GDHt bei der Biotransformation von Glycerin.

Um 3HPA vor weiterer Reduktion zu schützen, wurde wachsenden Zellen der Fängerstoff Semicarbazid zugegeben und klassische Fermentationen unter anderem mit *K. pneumoniae* durchgeführt (Vancauwenberge et al., 1990; Slininger und Bothast, 1985; Slininger et al., 1983; Abeles et al., 1960) und patentiert (Slininger et al., 1990). Ulmer und Zeng (2007) gelang durch dieses Verfahren unter zusätzlicher Zugabe aktiver Biomasse in einem Fed-Batch-Prozess 729 mM 3HPA als Semicarbazon herzustellen. Bei der Verwendung von hohen Mengen Semicarbazid bei wachsenden Zellen wurde dies als zelltoxisch beschrieben (Ulmer und Zeng, 2007; Slininger et al., 1983). Eine Regenerierung des 3HPA-Semicarbazons ist allerdings unsicher. Erste Untersuchungen deuten auf die Möglichkeit einer Verdrängungsreaktion mit Aceton hin (Ulmer, 2008). Ein Überblick über die Literaturbelege für die biotechnische Herstellung von 3HPA ist in Tab. 4 dargestellt.

Neben der Produktion von 3HPA zeigte sich eine äquimolare Bildung von 1,3-PDO und 3HP (Talarico und Dobrogosz, 1989; Talarico et al., 1988; Schütz und Radler, 1984; Sobolov und Smiley, 1960). Dies wird auf eine biologische Dismutation zurückgeführt, bei der zwei Aldehyd-Moleküle (3HPA) zu der korrespondierenden Säure (3HP) und dem korrespondierenden Alkohol (1,3-PDO) reagieren. Die dabei zugrunde liegenden Reaktionswege oder Enzymsysteme konnten bisher nicht aufgeklärt werden.

Da 3HPA als Zwischenprodukt bei der biotechnischen 1,3-PDO-Herstellung auftritt, kann es bei einer Hochzelldichtefermentationen zu einer Akkumulation kommen. Dies wurde als Ursache für die Hemmung des Zellwachstums identifiziert (Barbirato et al., 1998; Barbirato et al., 1996). Durch eine Überexpression der 1,3-PDO-Oxidoreduktase konnte dieses Problem behoben werden (Chen et al., 2009; Zhao et al., 2009; Hao et al., 2008; Zheng et al., 2008; Zheng et al., 2006). Des Weiteren entsteht 3HPA als Zwischenprodukt bei der Fermentation von Glycerin zu 3HP mittels einer Alkoholdehydrogenase (Andreeßen et al., 2010; Raj et al., 2008; Suthers und Cameron, 2005). Eine Enzyminhibierung durch die Akkumulation von 3HPA wird auch hier vermutet (Mohan Raj et al., 2009).

Tab. 4: Biotechnische Produktion von 3HPA als Endprodukt; (Auswahl)

Bakterium	Glycerin (g/L)	Semicarbazid (g/L)	3HPA (g/L)	Umsatz (% mol/mol)	Referenz
<i>K. pneumoniae</i> DSM2026	88,0 (956 mM)	92,0 (825 mM)	56,0 (756 mM)	79	Ulmer und Zeng (2007)
<i>K. pneumoniae</i> ATCC 8724	70,0 (760 mM)	40 (359 mM)	46,0 (621 mM)	82	Vancauwenberge et al. (1990)
<i>L. reuteri</i>	36,8 (400 mM)	-	17,4 (235 mM)	59	Doleyres et al. (2005)
<i>K. pneumoniae</i> ATCC 8724	49,9 (542 mM)	18,0 (161 mM)	13,9 (188 mM)	35	Slininger und Bothast (1985)
<i>K. pneumoniae</i> ATCC 8724	30,0 (326 mM)	26,8 (240 mM)	13,1 (177 mM)	54	Slininger et al. (1983)
<i>L. reuteri</i> SD2112	18,4 (200 mM)	-	12,6 (170 mM)	85	Vollenweider et al. (2003)
<i>L. reuteri</i>	18,4 (200 mM)	-	12,6 (170 mM)	85	Lüthi-Peng et al. (2002a)
<i>L. reuteri</i> 1063	27,6 (300 mM)	-	11,1 (150 mM)	50	Talarico et al. (1988)
	27,6 (300 mM)	33,5 (300 mM)	-	0	
<i>L. reuteri</i> NRRL 8-14171	13,8 (150 mM)	-	6,7 (90 mM)	60	Zamudio-Jaramillo et al. (2009)
<i>L. reuteri</i> PRO 137	27,6 (300 mM)	-	3,4 (45,7 mM)	15	Tobajas et al. (2007)
<i>L. reuteri</i> 12002	13,8 (150 mM)	-	2,8 (38 mM)	25	El-Ziney et al. (1998)
<i>Pantoea</i> <i>agglomerans</i>	66,8 (725 mM)	-	2,2 (30 mM)	4	Barbirato et al. (1995)
<i>L. reuteri</i>	18,4 (200 mM)	-	1,1 (15 mM)	13	Lüthi-Peng et al. (2002b)

Für die Quantifizierung von 3HPA sind mehrere Methoden verfügbar. Die einfachste Methode ist die Quantifizierung nach Circle et al. (1945) im colorimetrischen Test unter stark sauren Bedingungen. Dabei wird 3HPA zu Acrolein und dieses mit Tryptophan zu einem Farbkomplex umgesetzt, der photometrisch bei 560 nm nachgewiesen wird. Nach Hall und Stern (1950) befinden sich 3HPA und Acrolein in wässriger Lösung in einem pH-Wert- und temperaturabhängigen Gleichgewicht, das unter diesen Testbedingungen auf der Seite des Acroleins liegt. Des Weiteren kann 3HPA mittels HPLC (HPX-87H, BioRad, München, Deutschland) mit unterschiedlichen mobilen Phasen quantifiziert werden (Cleusix et al., 2007; Sung et al., 2003; Talarico et al., 1988).

1.6 Verwendung von Aldehydfängerstoffen

Zur Identifizierung des Zwischenproduktes 3HPA der enzymatischen 1,3-PDO-Bildung aus Glycerin wurde der Aldehydfängerstoff Semicarbazid mittels Schmelzpunktanalyse verwendet (Abeles et al., 1960). Bei der weiteren Verwendung dieses Fängerstoffs in der biotechnischen Herstellung von 3HPA aus Glycerin mit *K. pneumoniae* konnte eine folgende Reduktion zu 1,3-PDO verhindert und eine deutlich höhere Konzentration an 3HPA als Semicarbazon erreicht werden (Tab. 4). Obwohl eine Regenerierung des 3HPA aus diesem Carbazon bisher nur in basalen Versuchen untersucht wurde (Ulmer, 2008), ist die Bildung von Acrolein durch Säurekatalyse aufgrund des chemischen Gleichgewichtes zwischen 3HPA und Acrolein (Hall und Stern, 1950) möglich. Dies demonstriert sehr einfach der colorimetrische Test (Circle et al., 1945). Da Acrolein eine bedeutende Plattformchemikalie darstellt (Abschnitt 1.2), ist dieser Ansatz sehr interessant und die Verwendung von Aldehydfängerstoffen vielversprechend.

Aldehydfängerstoffe reagieren mit der Carbonylgruppe eines Aldehyds bzw. Ketons in einer Kondensationsreaktion, jedoch nicht mit Carbonsäuren, Amiden oder Estern. Es gibt sowohl qualitative als auch quantitative Nachweismethoden. Die Aussage über das Vorhandensein von Aldehyden kann unter anderem durch einen Farbumschlag eines Testreagenz erreicht werden. Purpald® zum Beispiel ist in der Lage, einen Aldehyd in Verbindung mit Luftsauerstoff zu einem violetten Farbkomplex umzusetzen, allerdings können hierbei keine Rückschlüsse auf den vorhandenen Aldehyd gezogen werden. Deutlich genauer ist die Schmelzpunktanalyse. Hierbei wird ein Fängerstoff verwendet, der bei positiver Reaktion mit dem Aldehyd im wässrigen Milieu auskristallisiert. Aufgrund bestehender Tabellen kann durch die Bestimmung des scharfen Schmelzpunktes dieser Kristalle auf den vorhandenen Aldehyd geschlossen werden.

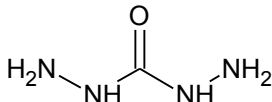
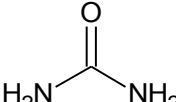
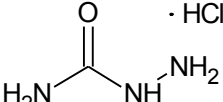
Neben Semicarbazid ist 2,4-Dinitrophenylhydrazin (DNPH) ein verbreiteter Fängerstoff, der zusätzlich zur qualitativen Bestimmung auch zu einer quantitativen Bestimmung herangezogen wird. Hierbei erfolgt die Hydrazonbildung der Aldehyde unter leicht sauren Bedingungen und die Quantifizierung mittels HPLC. Die Molekulargewichtsvergrößerung durch DNPH, vor allem bei kurzkettigen aliphatischen Aldehyden, verbessert die Auftrennung in der Chromatographie deutlich (Zwiener et al., 2002; Grosjean und Grosjean, 2001; Richardson et al., 2000).

Eine weitere Methode, Aldehyde zu quantifizieren, besteht in der photometrischen Analyse. Hierbei ist die Absorption des chromophoren Kondensates aus Aldehyd und Fängerstoff konzentrationsabhängig. Zu dieser Bestimmungsmethode gehört zum einen der colorimetrische Test zur Quantifizierung von Acrolein nach Circle et al. (Circle et al., 1945) und zum anderen die 3HPA- und Propanal-Quantifizierung nach Toraya et al. (1977) durch den Fängerstoff 3-Methyl-2-benzthiazolinon Hydrazon (MBTH).

Da sich Semicarbazid in biotechnischen Prozessen als Aldehydfängerstoff etabliert hat (Ulmer und Zeng, 2007; Slininger et al., 1990; Vancauwenberge et al., 1990; Slininger und Bothast, 1985; Büning-Pfaue und Rehm, 1972) und keine Auskristallisation des 3HPA-Semicarbazons erfolgt (Ulmer und Zeng, 2007), wurden aufgrund der giftigen und krebserzeugenden Wirkung gegenüber Menschen (de la Calle und Anklam, 2005) weitere Hydrazinderivate als Fängerstoffe gesucht. Carbohydrazid, das nach derzeitigem Kenntnisstand noch nie in einem biotechnischen Prozess verwendet wurde, ist als exzellenter Fängerstoff für freies Formaldehyd in der Textilindustrie bekannt (Northern Piedmont Section, 1980). Da Carbohydrazid bei vergleichbarer Aktivität zu Hydrazin deutlich weniger gefährlich bzw.

toxisch ist, dient es hauptsächlich der Sauerstoffentfernung bei der Heizwasseraufbereitung und zum Korrosionsschutz (ELIMIN-OX[®], AcceptaTM 2065, XF-701). Die Einstufung laut MSDS erfolgte für Menschen reizend und für Wasserorganismen toxisch. Obwohl die beiden Fängerstoffe Semicarbazid und Carbohydrazid vielfältig genutzt werden, ist relativ wenig über sie bekannt. In Tab. 5 sind grundlegende Eigenschaften zusammengefasst.

Tab. 5: Vergleich der Harnstoffderivate Carbohydrazid und Semicarbazid mit Harnstoff

Eigenschaft	Carbohydrazid	Harnstoff	Semicarbazid (Hydrochlorid)
Struktur-formel			
Cas Nummer	497-18-7	57-13-6	563-41-7
Molekular-gewicht	90,08 g/mol	60,06 g/mol	111,53 g/mol
Dichte	1,02 g/cm ³ bei 20°C	1,32 g/cm ³ bei 20°C	Nicht verfügbar
Schmelzpunkt	150-153°C	132,70°C	175-177°C

1.7 Immobilisierung

Biokatalysatoren weisen gegenüber chemischen Katalysatoren neben hohen Aktivitäten und Stereo- bzw. Regiospezifitäten auch das Vermögen auf, unter gemäßigten pH-Werten und Temperaturen bei Normaldruck zu agieren (Buchholz und Kasche, 1997; Klein und Vorlop, 1985). Mechanische bzw. chemische Einflüsse oder Separationsprozesse zur Wiederverwendung führen jedoch zu Inaktivierung, Verlust oder Zerstörung der Biokatalysatoren. Durch die Immobilisierung können diese Nachteile reduziert und zusätzlich höhere Raum-Zeit-Ausbeuten aufgrund der räumlichen Fixierung auf engstem Raum erreicht werden (Chibata et al., 1986; Klibanov, 1983). Zusätzlich ist durch die Fixierung eine Abtrennung vom Reaktionsmedium immens vereinfacht. Bei der Wahl der Immobilisierungsmethode müssen Parameter wie z.B. die Diffusionslimitierung oder die Inaktivierung der Biokatalysatoren durch die Immobilisierungsbedingungen berücksichtigt werden. Eine Übersicht der möglichen Immobilisierungsarten ist in Abb. 7 dargestellt.

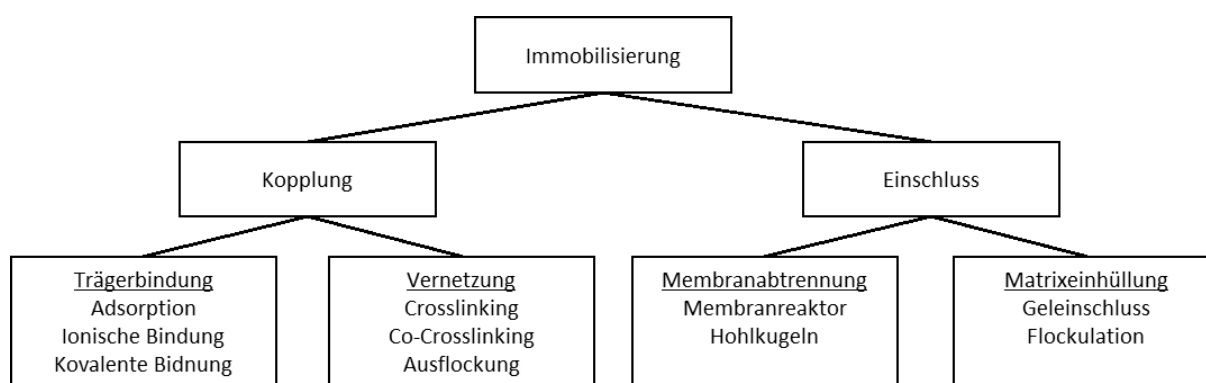


Abb. 7: Übersicht über Immobilisierungsmethoden; nach Hartmeier (1986)

Während bei der Immobilisierung durch Kopplung eine direkte Interaktion mit den Biokatalysatoren erfolgt, wird bei der Einschlussimmobilisierung lediglich ein Kompartiment erzeugt, dass die Verteilung der Biokatalysatoren im gesamten Reaktionsmedium verhindert und eine Konzentrierung auf engstem Raum erfolgt.

1.7.1 Quervernetzung mit Glutardialdehyd

Durch die kovalente Verbindung zwischen Crosslinkern (di- oder multifunktionale Reagenzien) und Biomolekülen werden dreidimensionale Strukturen erreicht. Dies führt zu einer örtlichen Trennung von Zellbestandteilen und zelleigene Abbaumechanismen werden unterbunden (Leuba und Widmer, 1979). Hierbei wird das kommerziell günstige Glutardialdehyd (GDA) aufgrund seiner hochreaktiven Eigenschaften hauptsächlich verwendet. Der unbegrenzt in Wasser oder organischen Lösungsmitteln mischbare C₅-Di-Aldehyd ist aufgrund seiner beiden Carbonylfunktionen in der Lage, als Verbindungsmolekül (Crosslinker) zu fungieren (Bickerstaff, 1997; Hartmeier, 1986). Untersuchungen zeigten die Ausbildung von komplexen Strukturen mehrerer GDA-Moleküle untereinander zu α , β -ungesättigten Aldehydpolymeren durch Aldolkondensation, sodass ein deutlich verzweigteres Netzwerk entsteht (Migneault et al., 2004; Kawahara et al., 1992; Korn et al., 1972). Dabei sind für eine erfolgreiche Vernetzung die Reaktionsbedingungen entscheidend und müssen an den jeweiligen Versuch angepasst werden (Migneault et al., 2004; Walt und Agayn, 1994). Analog zu den Aldehydfängerstoffen (Abschnitt 1.6) sind unter anderem Amino- oder Thiolgruppen an der Ausbildung der Verbindungen beteiligt (Okuda et al., 1991; Klibanov, 1983). Diese Fähigkeit wird unter anderem als Fixierungsmittel in der Immunchemie, der Elektronenmikroskopie und der Röntgenstrukturanalyse eingesetzt (Hayat, 1986; Douillard und Hoffman, 1983; Quiocho und Richards, 1964). Dabei ist der genaue Reaktionsmechanismus noch immer nicht vollständig aufgeklärt (Migneault et al., 2004; Kawahara et al., 1997; Kawahara et al., 1992; Richards und Knowles, 1968). Durch die unspezifische kovalente Bindung sind Aktivitätseinbußen z.B. aufgrund einer Bindung im aktiven Zentrum von Enzymen möglich. Im Gegenzug dazu konnte durch die GDA-Quervernetzung eine längere Biokatalysatorstandzeit erreicht werden (Mateo et al., 2007). Beide Ergebnisse sind entscheidend für die erfolgreiche Verwendung dieser Immobilisierungsmethode.

1.7.2 Matriceinschluss - LentiKats®

Bei der Immobilisierung durch Matriceinhüllung wird ein Polymer verwendet, der in der Lage ist, Biokatalysatoren einzuschließen. Dabei ist durch die richtige Wahl der Porosität bzw. des Cut-off ein Stofftransport bzw. -austausch mit der Umgebung, jedoch nicht der Übergang der Biokatalysatoren möglich, wobei diese Eigenschaften gegeneinander abgewogen werden müssen (Hartmeier, 1986; Rosevear, 1984). Hierfür können natürliche (Agar, Alginat, Chitosan, Gelatine, κ -Carrageen, Pectinat) oder synthetische (Polyacrylamid, Polycarbamoylsulfonat, Polyurethan, Polyvinylalkohol) Polymere verwendet werden. Während Biopolymere meist mit einem milden Immobilisierungsprozess einhergehen, sind diese oft unzureichend in ihrer Stabilität (Mattiasson, 1983) und biologisch relativ schnell abbaubar. Letzteres bedingt eine kostenintensive, sterile Prozessführung (Ohta et al., 1994; Maiorella et al., 1984; Hahn-Hägerdal und Mattiasson, 1982). Synthetische Polymere sind demgegenüber sehr stabil und selten biologisch abbaubar (Wittlich et al., 2004). Dadurch wird eine längere Standzeit der Immobilisate erreicht und durch eine unsterile Prozessführung kann eine erhebliche Kostenreduzierung bewirkt werden (Wittlich et al., 2004).

Die Herstellung von Polyvinylalkohol (PVA) erfolgt in Methanol durch die Polymerisierung von Vinylacetat zu Polyvinylacetat und der anschließenden Abspaltung der Acetatgruppen (Herrmann und Haehnel, 1927; Staudinger et al., 1927). Es findet Verwendung in der Farb-, Klebstoff-, Kunststoff-, Papier-, Textil- und Verpackungsindustrie (Clariant GmbH, 1999). Als Grundstoff zur Ausbildung von PVA-Hydrogelen wird bei der sogenannten Kryogelierung (freeze-thaw) durch wiederholtes Einfrieren und Auftauen ein stabiles Hydrogel ausgebildet

(Vorlop und Remmers, 1991; Lozinsky et al., 1986), jedoch können bei der Immobilisierung von Ganzzellkatalysatoren bei dieser Methode Zellschäden aufgrund der mehrfach niedrigeren Temperaturen von -20°C und tiefer verursacht werden. Für *L. reuteri* konnte bereits eine deutliche Verringerung der Überlebensrate bei diesen Temperaturen gezeigt werden (Tsen et al., 2007).

Für ein stabileres Hydrogel bei einmaligem Einfrieren hat sich die Zugabe von Alkoholen (z.B. Glycerin oder Polyethylenglycol) bewährt (Vorlop und Remmers, 1992). Aufgrund der negativen Wirkung auf Biokatalysatoren und des hohen Energieaufwandes wurde ein Verfahren unter Zugabe von Hydroxy- bzw. Aminogruppen zur Herstellung stabiler Hydrogele bei Raumtemperatur durch Vorlop und Ding (1997) entwickelt. Mit einer anderen neuartigen Herstellungsmethode für PVA-Hydrogele werden LentiKats[®] bei Raumtemperatur hergestellt (Vorlop und Jekel, 2000; Jekel et al., 1998a; Jekel et al., 1998b). Dabei werden einfach, schnell und effizient kostengünstige Immobilisate unter biokatalysatorschonenden Bedingungen erzeugt, die biologisch schwer abbaubar sind, keine Toxizität gegenüber den Biokatalysatoren zeigen und kein Gegenion zur Stabilisierung benötigen (Wittlich et al., 2004).

LentiKats[®] besitzen aufgrund ihrer geringen Dicke (bis 400 μm , Abb. 8) sehr gute Diffusionseigenschaften, wobei dennoch aufgrund des relativ großen Durchmessers eine einfache Rückhaltung bzw. Abtrennung vom Reaktionsmedium problemlos möglich ist (Jekel et al., 1998b). Durch ihre mechanische Elastizität und chemische Stabilität sind LentiKats[®] auch für Rühr- und Wirbelschichtreaktoren geeignet (Schlieker und Vorlop, 2006; Wittlich et al., 2004; Gröger et al., 2001). Durch den geringen Zeitaufwand und den milden Immobilisierungsbedingungen ist zudem der Einschluss von empfindlichen Zellen möglich. Eine kommerzielle bzw. industrielle Herstellung im Tonnen-Maßstab ist zudem bereits verfügbar (LentiKats[®], Prag, Tschechien). Die Entsorgung der Immobilisate ist nach der thermischen Inaktivierung der Biokatalysatoren auf verschiedenen Wegen möglich (Larking et al., 1999; Schonberger et al., 1997; Yu et al., 1996; Baimuratov et al., 1993; Kuznetsova et al., 1992).

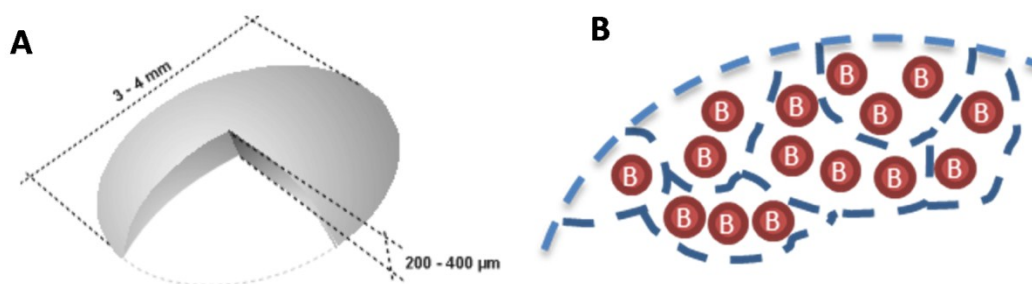


Abb. 8: **Schematische Darstellung eines LentiKat[®]-Immobilisates**; (A) Übersicht (Quelle GeniaLab[®]) und (B) schematische Kompartimentierung der Biokatalysatoren (B) im Querschnitt

1.7.4 Immobilisierung von *L. reuteri*

L. reuteri wurde bisher aufgrund diverser Fragestellungen auf verschiedene Weise immobilisiert. Zunächst konnte die Eigenschaft gezeigt werden, dass *L. reuteri* in der Lage ist, aufgrund eines Oberflächenproteins mit humanen Fibronectin- und Collagenfasern zu interagieren (Lorca et al., 2002; Aleljung et al., 1994). Dadurch wurde eine Bindung des Biokatalysators an auf Glaskugeln immobilisierten Fasern ermöglicht (Lindgren et al., 1992). Diese Umsetzung der Immobilisierung ist jedoch für einen großtechnischen Prozess aufgrund der Mahlwirkung der Glaskugeln bei Bewegung ähnlich einer Kugelmühle ungeeignet. Im Gegensatz dazu konnte eine erfolgreiche kovalente Immobilisierung an Kieselgel zur Herstellung von konjugierter Linolsäure erreicht werden (Lee et al., 2003). Es wurde eine optimale Biokatalysatorbeladung von 10 mg Zellen pro g Trägermaterial bei einem optimalen pH-Wert von 10,5 ermittelt. Allerdings konnten die Immobilisate jedoch nur 5fach wiederverwendet werden. Für die Verwendung von *L. reuteri* als probiotischer Zusatz in der Nahrungsmittelindustrie wurde der Einfluss einer Einschlussimmobilisierung in Alginat bzw. κ -Carrageen untersucht. Dabei zeigte sich bei der Lagerung von unter -20°C in den Alginat-immobilisaten eine erhöhte Überlebensrate im Gegensatz zu κ -Carrageen oder freien Zellen (Tsen et al., 2007).

Für die Produktion von 3HPA bzw. Reuterin mithilfe von immobilisierten Mikroorganismen sind nach derzeitigem Kenntnisstand bisher nur zwei Literaturbelege bekannt. Um den Einfluss von Reuterin auf die Bakterienpopulation im menschlichen Darm zu untersuchen, wurden durch Cleusix et al. (2008) menschliche Stuhlproben immobilisiert. In diesen Polysaccharidgel-Einschlussimmobilisaten aus Gellan (2,5 % w/v) und Xanthan (0,25 % w/v) konnte unter Zugabe von mindestens 100 mM Glycerin und der daraus resultierenden Reuterinbildung eine signifikante Reduzierung der *Escherichia coli* Population gezeigt werden. Für einen biotechnischen Ansatz zur Untersuchung der Reuterinproduktion wurde von Zamudio-Jaramillo et al. (2009) Reinkulturen von *L. reuteri* in Alginathydrogelen immobilisiert. Bei 25°C Biotransformationstemperatur und 150 mM Glycerin kam die Reaktion nach 7 h Reaktionszeit zum Erliegen und es konnte lediglich eine maximale 3HPA-Konzentration von 82 mM mit suspendierten bzw. 86 mM mit immobilisierten Zellen erzielt werden. Dabei zeigte sich die gleiche maximale Reuterinproduktion bei einer Zellkonzentration von $4,37 \times 10^{10}$ cfu/mL (cfu = colony forming units) in den Immobilisaten gegenüber $7,48 \times 10^{10}$ cfu/mL suspendierter Zellen. Zusätzlich wurde eine signifikante Erhöhung der Produktivität beobachtet, die die Vorteile der Immobilisierung bezüglich der geringeren Biokatalysatormenge und der erhöhten Produktivität gegenüber freien Zellen bestätigt.

1.8 Zielsetzung

Gegenstand des Projektes ist die Untersuchung und Optimierung eines biotechnischen Verfahrens zur Herstellung von 3HPA aus Glycerin. 3HPA und seine Derivate (Reuterin) sind schon lange als biologisch aktive Substanzen bekannt. Die Reinsubstanz 3HPA ist aufgrund seiner Funktionalität für die chemische Industrie von Interesse und kann als Ausgangspunkt zahlreicher Plattformchemikalien, wie z.B. Acrolein und Acrylsäure, dienen. Ein Problem stellt die kostengünstige Herstellung dar. Obwohl Glycerin in großen Mengen als Nebenprodukt bei der Biodiesel-Herstellung anfällt und bei einem wachsenden Bio-Diesel-Markt als kostengünstige Quelle dienen könnte, bereitet die Toxizität des entstehenden Endproduktes 3HPA im biotechnischen Prozess große Probleme. Die erreichte Produktkonzentration und die Standzeit der Biokatalysatoren waren zu Projektbeginn zu gering und sollten durch geeignete Verfahren erhöht werden.

Wenn es gelingt, die Zellen durch Immobilisierung zu stabilisieren und die Toxizität des Produktes durch geeignete Reaktionsbedingungen zu reduzieren, ist es denkbar, Biomasse über einen längeren Zeitraum zur Produktion von 3HPA einzusetzen.

Somit sind die Hauptziele der vorliegenden Arbeit:

- Optimierung der Biomasseanzucht von *L. reuteri*
- Charakterisierung relevanter Parameter auf die Biokatalysatorstandzeit von *L. reuteri* und die 3HPA-Produktion in der Biotransformation
- gezielte Optimierung der Biotransformation sowohl mit immobilisierten als auch mit suspendierten Zellen
- Verringerung der Nebenprodukte
- Erarbeitung von Strategien zur biotechnischen Umsetzung im industriellen Maßstab

2. Material & Methoden

2.1 Doppelfermentersystem-Entwicklung

Für dieses Projekt wurde ein spezielles Doppelfermentersystem geplant und eigenständig aufgebaut. Das Prinzip der Doppelfermentation hat sich in der Vergangenheit bezüglich der Erkennung von Unregelmäßigkeiten in der Bakterien-Kultivierung bewährt, da immer ein Fermenter mit identischem Inokulum als Referenz dient und in dem anderen eine Parameteränderung vorgenommen wird. Dieses System wurde geplant, um die Biotransformationsbedingungen zu optimieren, aber auch alle möglichen Fütterungsstrategien (z.B. Batch, Fed- Batch, Conti) betreiben zu können. Zwecks Flexibilität für An- und Umbauten wurde dabei von einem kommerziell angebotenen Komplettsystem abgesehen. Beide Fermenter sind getrennt regel-, steuer- und temperierbar und sowohl die Datenerfassung als auch die Regelung erfolgen online und vollständig digital mittels der Mess- und Steuersoftware DasyLab[®] 10 (National Instruments, Austin, USA). In Tab. 6 sind die verwendeten Geräte aufgelistet und Abb. 9 stellt das endgültige Doppelfermentersystem dar.

Tab. 6: Geräteliste des Doppelfermentersystems

(Anzahl) Gerät	Typ	Hersteller
(2) Glasfermenter (90 mL)	Titriergefäß mit Thermostatmantel	Metrohm, Filderstadt, Dtl.
(2) Glasfermenter (500 mL)	Maßanfertigung	Glasgerätebau Schmidt, Braunschweig, Dtl.
(2) Glasfermenter (1000 mL)	Maßanfertigung	
(2) Abluftkühler	Maßanfertigung	
(1) Serielle Interfacebox	C320 Turbo (1x) und C32047T (2x)	Moxa, Brea, USA
(2) Feed-Waage	EW 6200-2NM	Kern, Balingen-Frommern, Dtl.
(2) Lauge-Waage	EG 620-3NM	
(2) Magnetrührer	Ikamag [®] RCT basic	Ika, Staufen, Dtl.
(2) Magnetrührerhalter	Clip Fish [®]	Bürkle, Bad Bellingen, Dtl.
(5) pH/mV/T-Multimeter	340i	WTW, Weilheim, Dtl.
(2) pH/T-Kombinationselektrode	SL 81-225pHT	SCHOTT Instruments GmbH, Mainz, Dtl.
(2) Redox-Elektrode	SL 89-225PT	
(6) Schlauchpumpen	REGLO Digital MS-2/8-160	Ismatec, Glattbrugg, Schweiz
(2) Sauerstoff-Messgerät	Fibox 3	Presens, Regensburg, Dtl.
(2) Sauerstoff-Optode	OIM-PSt3-D12/L120-L2.5	
(1) Sauerstofffilter für N ₂	CP7980; CP17970; CP7981	Varian, Darmstadt, Dtl.
(2) Gasdurchflussmesser	Q55-AV-S1-M-An.nA - A	HTK, Hamburg, Dtl.
Sauerstoffresistente Schläuche	Norprene A 60 F bzw. G	Saint-Gobain, Charny, Frankreich
(3) Kryostate	F25	Julabo, Seelbach, Dtl.

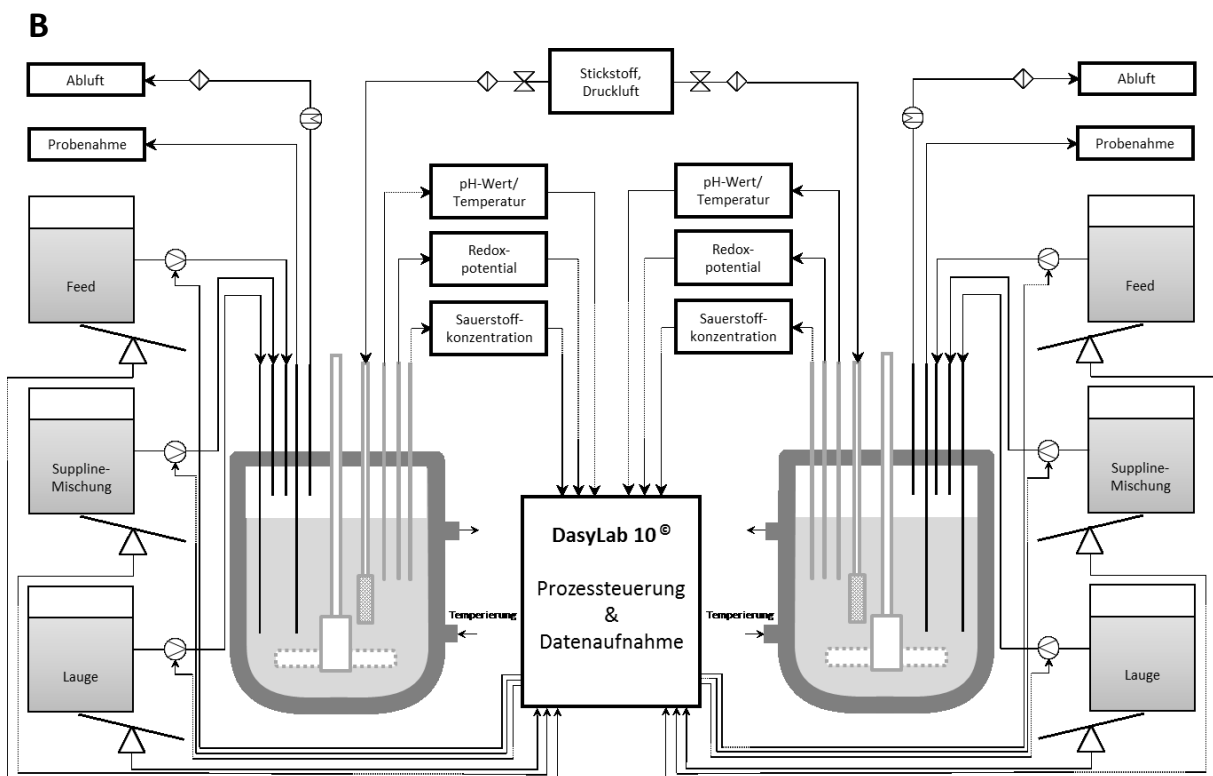
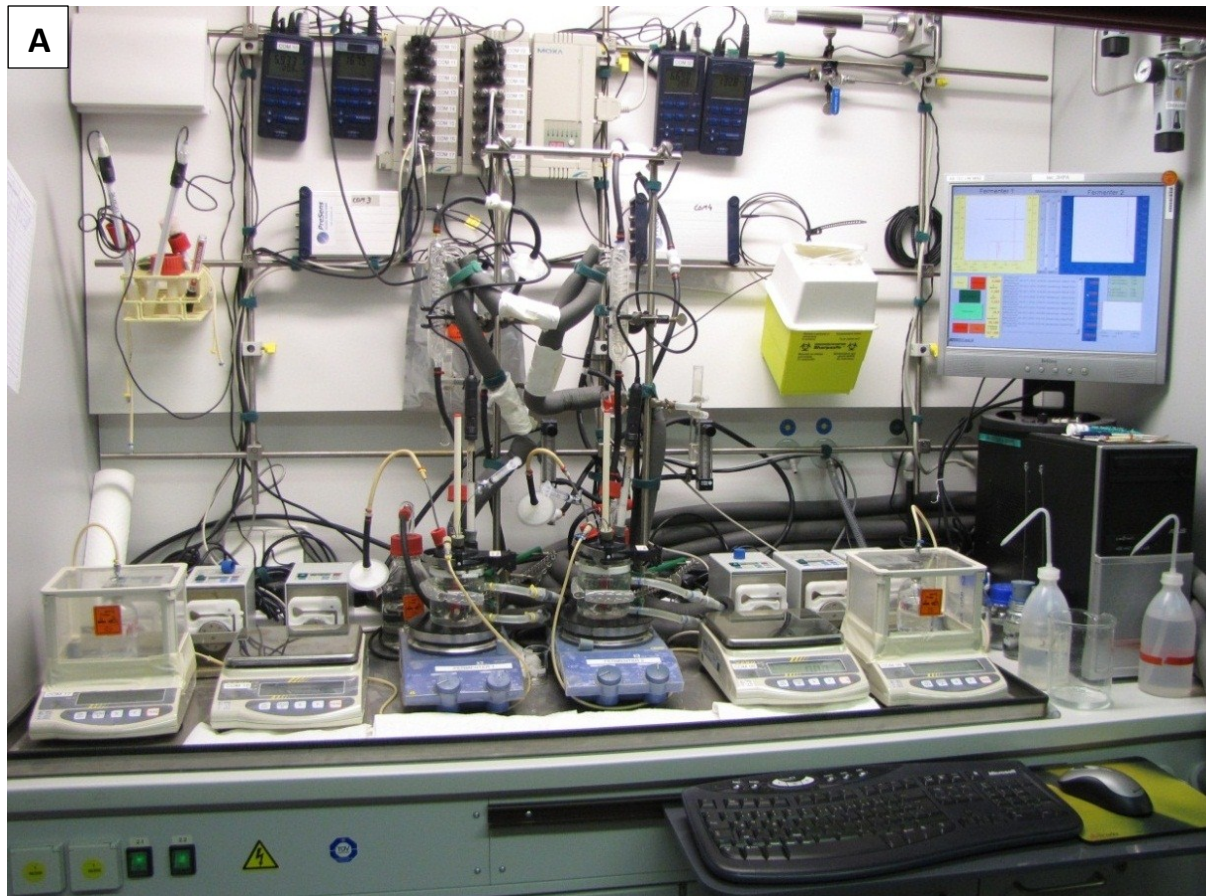


Abb. 9: Doppelfermenteranlage mit computergestützter, digitaler Regelung und Datenerfassung; (A) Photographie und (B) schematische Darstellung (nicht gezeigt Thermostate zur Temperaturregelung der Fermenter und der Abluftkühlung)

Es ist möglich, online und digital den pH-Wert, die Temperatur, das Redoxpotential, den Sauerstoffpartialdruck (pO_2) und alle Massen-Ströme aufzunehmen und zu speichern. Die pH-Regelung erfolgt dabei softwaregesteuert. Das Korrekturmittel (5 M KOH) wird über eine Schlauchpumpe mittels Kapillare ($\approx 250 \mu m$) im μL Maßstab direkt in das Medium dosiert. Um die Sauerstoffkontamination zu minimieren, wurde als Schlauchmaterial Norprene® A-60-F aufgrund der besseren Säure- bzw. Laugenresistenz gegenüber Tygon® verwendet und alle Zugänge in den Fermentern mit Butylgummi-Stopfen verschlossen. Diese Materialien haben eine sehr geringe Sauerstoffdurchlässigkeit und sind mehrfach autoklavierbar. Die Biotransformationen wurden im 50-mL, 200-mL und 1000-mL Maßstab in doppelwandigen, temperierbaren Glasfermentern durchgeführt (Abb. 10). Durch die verwendete Steuer- und Regelsoftware DasyLab® 10 ist es möglich, sowohl digitale Geräte als auch analoge (über Konverter) zu integrieren. Das erarbeitete und optimierte Schaltbild befindet sich detailliert in Anhang 7.1.1.

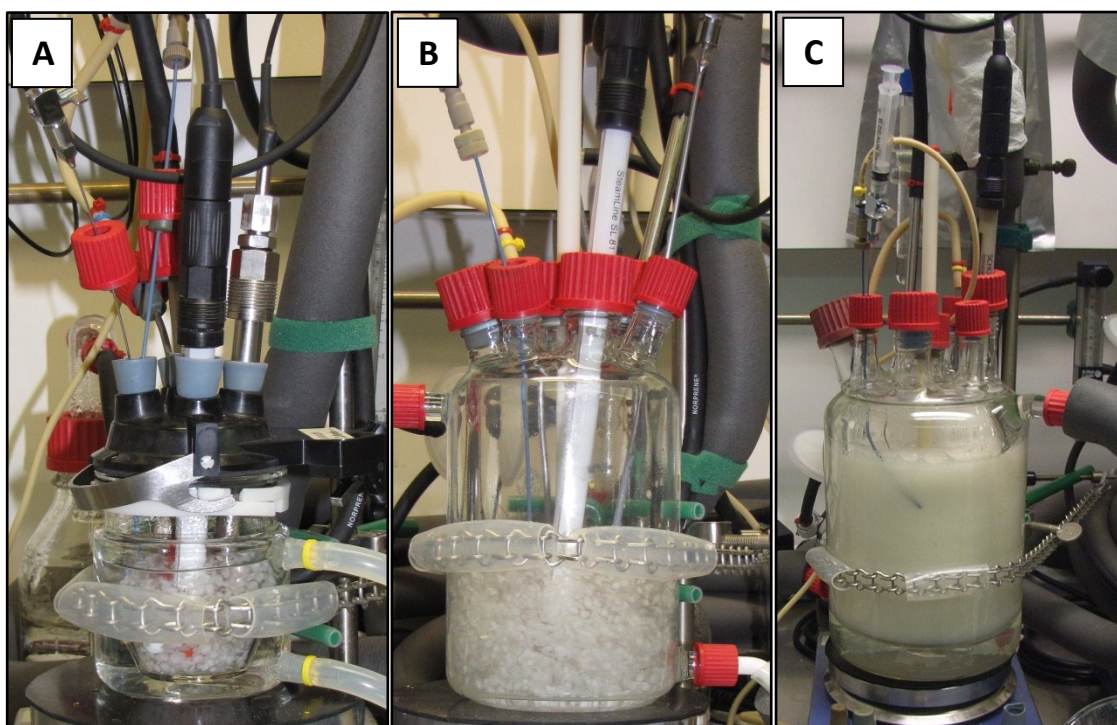


Abb. 10: **Verwendete Fermenter**; Maximalvolumen von (A) 90 mL, (B) 500 mL und (C) 1000 mL, A und B mit LentiKat®-Immobilisaten, C mit Zellsuspension von *L. reuteri*

2.2 Bakterienstamm und Zellanzucht

2.2.1 *Lactobacillus reuteri* SD2112

Der für diese Arbeit verwendete Bakterienstamm *L. reuteri* SD2112 wurde von Creavis – Science to Business Center (Evonik Degussa GmbH, Marl, Dtl.) dem Johann Heinrich von Thünen Institut (ehemals FAL) zur Verfügung gestellt. Dieser Stamm ist identisch mit *L. reuteri* ATCC 55730 und ist in Abb. 11 dargestellt.



Abb. 11: Lichtmikroskopische Aufnahme von *L. reuteri* SD2112; Balken entspricht 20 µm

2.2.2 Mikroskopie

Um eventuelle Kontaminationen oder Veränderungen der Bakterien frühzeitig zu erkennen, wurde die Zellmorphologie der Bakterien regelmäßig überprüft. Die Präparate wurden mit einem 100fachen Ölimmersionsobjektiv untersucht, mittels Digitalkamera dokumentiert und gespeichert. Als Bildverarbeitungssoftware wurde analySIS 5.0 (Olympus Soft Imaging Solutions GmbH, Münster, Dtl.) verwendet.

2.2.3 Mediumherstellung und Anzucht im Batch-Verfahren

Für die Kultivierung von *L. reuteri* wurde das MRS-Medium nach De Man, Rogosa und Sharpe (1960) verwendet (Tab. 7).

Tab. 7: Zusammensetzung des MRS-Mediums

Komponente	Konzentration
Pepton	10 g/L
Fleischextrakt	8 g/L
Hefeextrakt	4 g/L
K ₂ HPO ₄	2 g/L
(NH ₄) ₂ Citrat	2 g/L
NaAcetat	5 g/L
MgSO ₄	0,2 g/L
MnSO ₄	0,05 g/L
Tween 80	1 mL/L
Glucose	100 mM
Glycerin	20 mM

Bei der Benutzung von kommerziell erhältlichem MRS-Komplett-Medium (Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Dtl.) kommt es nach 12 min bei 121°C durch unerwünschte Maillardreaktionen zu einer dunkelbraunen Verfärbung des Mediums. Deshalb wurde das Medium selbst hergestellt und die getrennt autoklavierten Substrate Glucose und Glycerin zugegeben. Zur vereinfachten Mediumherstellung wurde eine 50fach konzentrierte Stammlösung der Salze (K_2HPO_4 , $(NH_4)_2$ -Citrat, Na-Acetat, $MgSO_4$ und $MnSO_4$) verwendet.

Für aerobe Kultivierungsbedingungen wurde das Medium zur Hälfte in 1-L- bzw. 2-L-Schraubdeckelflaschen (Schott AG, Mainz, Dtl.) gefüllt und autoklaviert (121°C, 1 bar, 20 min). Nach dem Abkühlen wurde das Medium mit einer 40fach konzentrierten Substratlösung (4 M Glucose und 0,8 M Glycerin) komplettiert. Die Biomasseherstellung erfolgte geschüttelt (80 rpm, 50 mm Schütteldurchmesser) mit halboffenem Deckel.

Für mikroaerobe Bedingungen wurden 1-L-Schraubdeckelflaschen (Schott AG, Mainz, Dtl.) maximal mit Medium gefüllt. Die Inkubation erfolgte nicht geschüttelt (stehend) mit halboffenem Deckel.

Für die anaerobe Kultivierung wurden zur Hälfte mit Medium gefüllte 100-mL-Rollrandflaschen (Ochs, Bovenden/Lengler, Dtl.) oder 2-L-Schraubdeckelflaschen (Schott AG, Mainz, Dtl.) mit Butylgummistopfen verschlossen und zusätzlich mit einer Aluminiumkappe gesichert, die einen Zugang zum Medium per Kanüle erlaubt. Anschließend wurde der Sauerstoff aus den Lösungen durch eine Anaerobisierungsanlage nach Neumann (1993) entfernt (Abb. 12). Hierbei wird abwechselnd bei 30facher Wiederholung im 2-min-Turnus die Gasphase durch Vakuum entfernt und anschließend durch Stickstoff ersetzt. Nachfolgend wurden die Gebinde bei 121°C und 1 bar für 20 min autoklaviert. Als Substrat diente eine 40fach konzentrierte Stammlösung (4 M Glucose und 0,8 M Glycerin), die getrennt anaerobisiert und sterilisiert wurde. Die Medien wurden nach dem Autoklavieren mit der 40fach konzentrierten Substratlösung steril und anaerob mittels Spritze und Kanüle komplettiert.

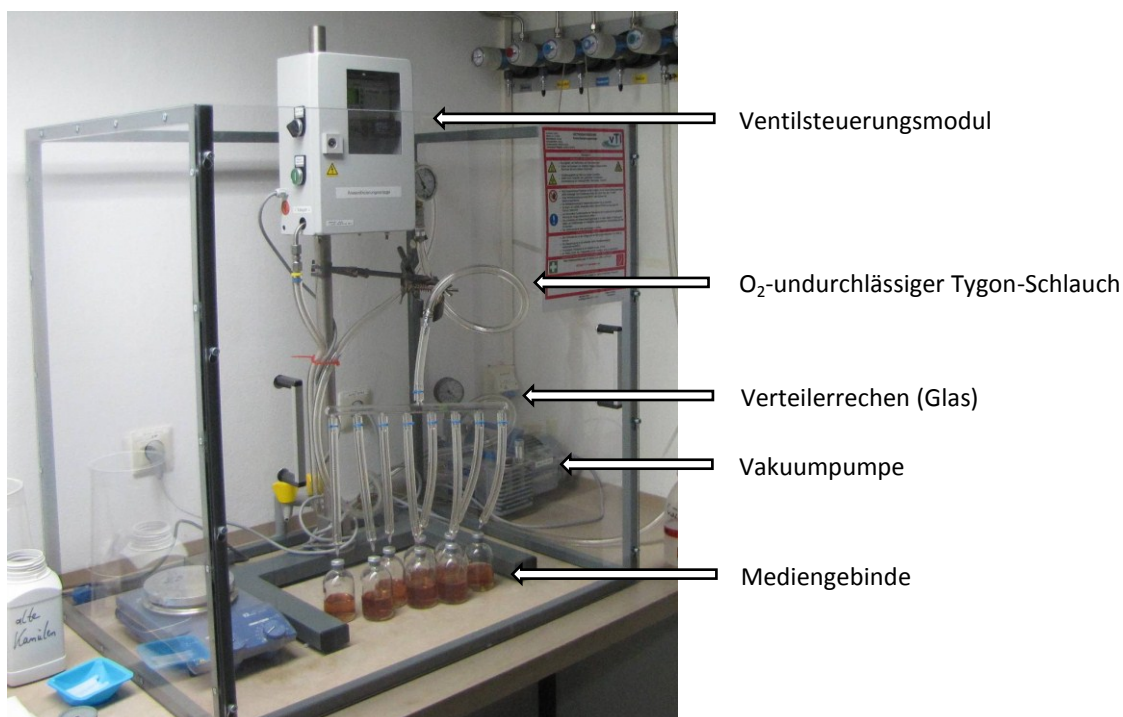


Abb. 12: Anaerobisierungsanlage nach Neumann (1993); Entfernung von Restsauerstoff für anaerobe Medien bzw. Lösungen

Für die anaerobe Biomasseherstellung im Batch wurden die Kulturgefäße 1 %ig mit einer gut gewachsenen Kultur oder einer Kryokultur angeimpft. Die Inkubation erfolgte für 9 h bei 37°C oder für 15 h bei 33°C und 80 rpm Schüttelgeschwindigkeit (50 mm Auslenkung). Bei Gebindegrößen ab 1 L Medium wurde aus Sicherheitsgründen nach der Inkubation vor Ort der entstandene Überdruck mittels einer Kanüle sofort reduziert.

2.2.4 Supplineoptimierung in einer 0,2-L-Fed-Batch-Fermentation

Für die Optimierung der Supplineversorgung während der Fed-Batch-Fermentation im 10 L-Maßstab wurde das Doppelfermentersystem (Abschnitt 2.1) mit den 500 mL Glasfermentern (Arbeitsvolumen 200 mL) ausgerüstet. Das Medium wurde vorgelegt und mit den kalibrierten Elektroden autoklaviert (121°C, 1 bar, 20 min). Die Anaerobiosis wurde während der gesamten Fermentation durch eine permanente Stickstoffbegasung ($0,01 \text{ L} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$) sichergestellt. Nach dem Erreichen einer Temperatur von 37°C und eines konstanten pH-Wertes von pH 7 wurde mit 3 % einer gewachsenen Vorkultur inokuliert und die Fermentation mit 100 mM Glucose und 20 mM Glycerin bei 500 rpm gestartet. Die jeweils zu untersuchende Supplinlösung wurde mittels einer Doppelschlauchkassette mit der Substratlösung (4 M Glucose und 0,8 M Glycerin) gekoppelt zugegeben. Die Zusammensetzung der einzelnen Lösungen ist in Tab. 8 zusammengefasst. Die Probenahme erfolgte steril über eine Kanüle/ Spritze mit Absperrhahn.

Tab. 8: Zusammensetzung der Supplinelösungen für die Optimierung der Zellanzucht im Fed-Batch

Komponente	Konzentration
Substratlösung (40fach)	
Glucose	793 g/L (4 M)
Glycerin	73,7 g/L (0,8 M)
MRS-Supplinelösung (20fach)	
Fleischextrakt	160 g/L
Hefeextrakt	80 g/L
Pepton	200 g/L
optimierte Supplinelösung (20fach)	
Fleischextrakt	200 g/L
Hefeextrakt	20 g/L
Pepton	20 g/L
Peptonlösung (standardisiert auf 200 g/L)	
Pepton	200 g/L
Fleischextraktlösung (standardisiert auf 200 g/L)	
Fleischextrakt	200 g/L
Hefeextraktlösung (standardisiert auf 200 g/L)	
Hefeextrakt	200 g/L
Vitaminlösung (20fach) (nach DSMZ-Medium DSM 141, sterilfiltriert)	
Biotin	40 mg/L
Folsäure	40 mg/L
Pyridoxin-HCl	200 mg/L
Thiamin-HCl x 2 H ₂ O	100 mg/L
Riboflavin	100 mg/L
Nicotinsäure	100 mg/L
D-Ca-Pantothenat	100 mg/L
Vitamin B ₁₂	2 mg/L
p-Aminobenzoessäure	100 mg/L
Liponsäure	100 mg/L
Spurenelementlösung (20fach) (nach DSMZ-Medium DSM 141, sterilfiltriert)	
Nitrilotriessigsäure	30,0 g/L
MgSO ₄ x 7 H ₂ O	60,0 g/L
MnSO ₄ x H ₂ O	10,0 g/L
NaCl	20,0 g/L
FeSO ₄ x 7 H ₂ O	2,0 g/L
CoSO ₄ x 7 H ₂ O	3,6 g/L
CaCl ₂ x 2 H ₂ O	2,0 g/L
ZnSO ₄ x 7 H ₂ O	3,6 g/L
CuSO ₄ x 5 H ₂ O	0,2 g/L
KAl(SO ₄) ₂ x 12 H ₂ O	0,4 g/L
H ₃ BO ₃	0,2 g/L
Na ₂ MoO ₄ x 2 H ₂ O	0,2 g/L
NiCl ₂ x 6 H ₂ O	0,6 g/L
Na ₂ SeO ₃ x 5 H ₂ O	6,0 mg/L

2.2.5 Biomasseanzucht in einer Fed-Batch Fermentation im BiostatE®

Für die Zellanzucht im 8-L bzw. 10-L-Fed-Batch-Verfahren wurde ein 15-L-Fermenter BiostatE® (Braun, Melsungen, Dtl.) eingesetzt (Abb. 13). Durch die integrierte Mess- und Regeltechnik konnte vollautomatisch der pH-Wert mit 10 M KOH, die Temperatur und die Rührgeschwindigkeit geregelt, sowie das Redoxpotential gemessen werden. Zusätzlich wurde das System mit der computergestützten Datenerfassung DasyLab® 10 (National Instruments, USA), einer Trübungssonde, einem optischen Sauerstoffmessgerät, einer Mehrfachschlauchkassetten-Pumpe mit Waagen zur Feed- und Supplinezugabe sowie einer CO₂/O₂-Abgasmesseinheit erweitert. Alle verwendeten Geräte sind in Tab. 9 zusammengefasst.

Tab. 9: Geräteliste des 15-L-Fermenterstands BiostatE®

Gerät	Typ	Hersteller
Bioreaktor	15-L-BiostatE	Braun Biotech International, Melsungen, Dtl.
pH-Elektrode	405-DPAS-SC-K8S/120	Mettler Toledo, Giessen, Dtl.
Sauerstoff-Optode	OIM-PSt3-D12/L120-L2.5	Presens, Regensburg, Dtl.
Sauerstoff-Messgerät	Fibox 3	
Redox-Elektrode	Pt-4865-90-VT	Ingold, Frankfurt, Dtl.
Trübungssonde	AF 44 S	Aquasant, Wettingen, Schweiz
Trübungs-Messgerät	AS 82	
Feed-Waagen	EW 6200-2NM	Kern, Balingen-Frommern, Dtl.
Feed-Pumpe	REGLO Digital MS-2/8-160	Ismatec, Glattbrugg, Schweiz
Abgasmesseinheit	BCpreFerm für CO ₂ und O ₂	BlueSens Gas Sensor GmbH, Herten, Dtl.

Für die Fermentation wurden die Sauerstoff-Optode und die pH-Elektrode kalibriert, die Abweichung der Redox-Elektrode bestimmt, 8 bzw. 10 L MRS-Medium ohne Substrat vorgelegt und 20 min bei 121°C und 1 bar Überdruck autoklaviert. Nach dem aseptischen Anschluss der Stickstoffbegasung und des Abluftfilters mit dessen Durchflusskühler konnte bis zum Erreichen der Betriebstemperatur von 37°C kein Sauerstoff über 0,03 % Luftsättigung gemessen werden (Messgrenze). Als Inokulum dienten 300 mL (3 %) einer gut gewachsenen Vorkultur. Die Fermentation wurde mit 250 mL Substratlösung (Tab. 10) bei 37°C und 100 rpm gestartet. Der anfängliche pH-Wert von pH 6,8 wurde erst bei pH 5,5 konstant gehalten (Doleyres et al., 2005). Nach 4 h Fermentation wurden alle 2 h 270 g Substratlösung und 180 g optimierte Supplinlösung über eine Schlauchpumpe mit einer Doppelschlauchkassette zugegeben (20 min). Beide Lösungen wurden vorab autoklaviert, jedoch technisch bedingt nicht anaerobisiert. Die Zusammensetzung der Feedlösungen ist in Tab. 10 dargestellt.

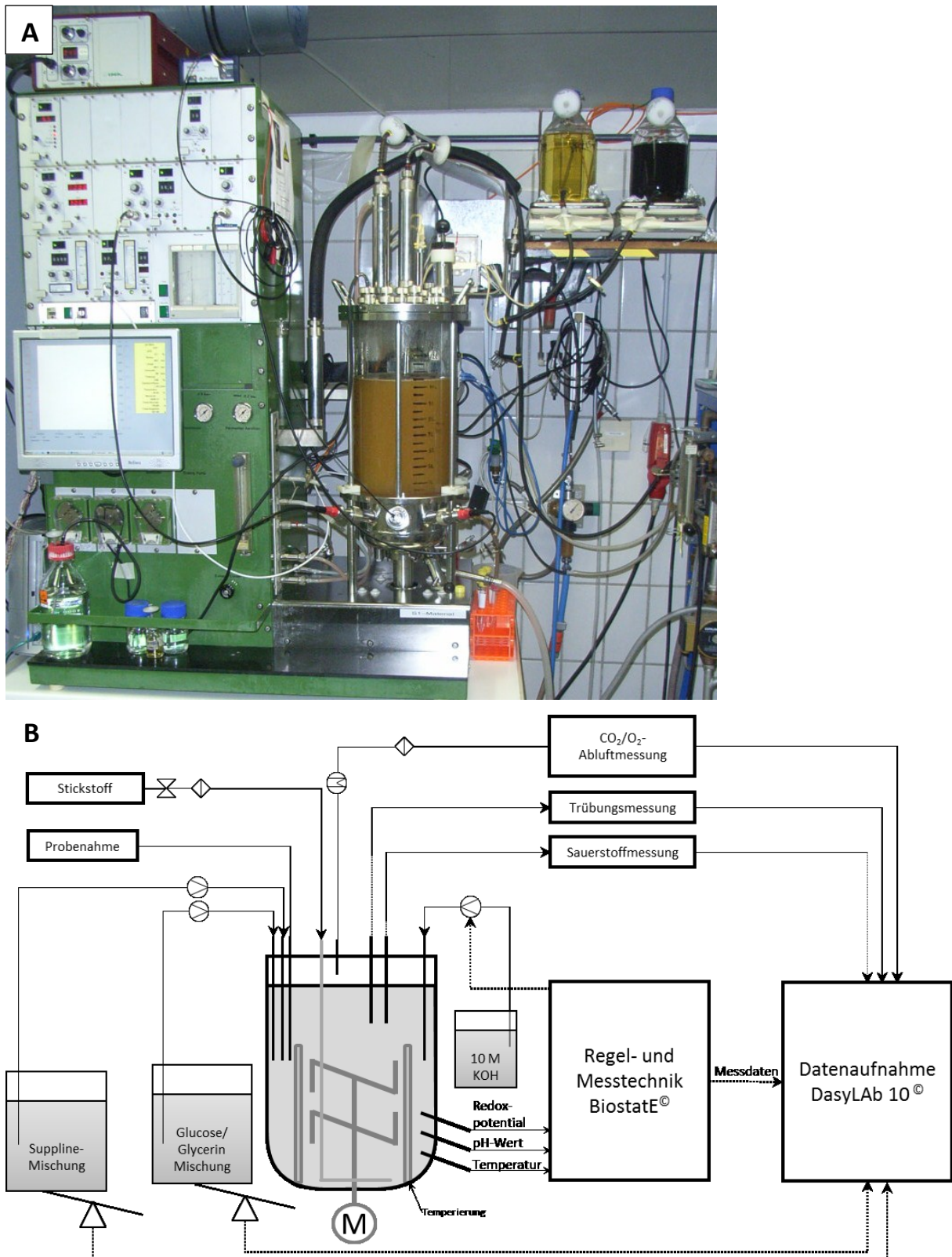


Abb. 13: 10-L-Biomasseherstellung für Optimierungsversuche im BiostatE®-Fermenterstand; (A) Photographie und (B) schematische Darstellung (37°C, pH 5,5, 100 rpm, anaerob)

Tab. 10: Zusammensetzung der Feedlösungen für die Zellanzucht im Fed-Batch

Komponente	Konzentration
Substratlösung (40fach)	
Glucose	793 g/L (4 M)
Glycerin	73,7 g/L (0,8 M)
Optimierte Supplinellösung (20fach)	
Fleischextrakt	200 g/L
Hefeextrakt	20 g/L
Pepton	20 g/L

Mittels Probenahme wurde die optische Dichte bei 600 nm erfasst. Die Bestimmung der Metaboliten erfolgte mittels HPLC in einer zellfreien 1:100 Verdünnung.

2.2.6 Zellernte und Zellsuspensionsherstellung

Die Zellernte der gewachsenen Bakterienkultur erfolgte durch Zentrifugation (4000 x g, 4°C, 10 min) in einer 4x1-L-Becherzentrifuge (ZK 630, GHG Hermle, Wehingen, Dtl.). Der Überstand wurde verworfen und die Pellets jeweils in 1000 mL 0,1 M Kaliumphosphat Puffer (KPP, Abschnitt 2.5) pH 7 resuspendiert. Nach erneuter Zentrifugation (4000 x g, 4°C, 10 min) wurden die Pellets jeweils in 25 mL Reaktionspuffer resuspendiert und vereinigt. Anschließend wurde durch Verdünnung mit dem Reaktionspuffer eine Zellkonzentration von 10^{10} Zellen/mL ($OD_{600} = 30$) eingestellt und die Zellsuspension sofort verwendet. Die Kurzzeitlagerung dieser Zellsuspension erfolgte unter Stickstoffatmosphäre bei 4°C.

2.3 Stammhaltung

2.3.1 -80°C - Stammhaltung

Für die Stammhaltung bei -80°C wurde eine gut gewachsene Kultur von *L. reuteri* SD2112 im gleichen Verhältnis mit MRS-Medium, das 6 % (w/v) Magermilchpulver und 10 % (v/v) Glycerin enthielt, gemischt. Diese Suspension wurde in anaerobisierte Vials mittels Spritze und Kanüle aliquotiert und bei -80°C gelagert.

2.3.2 -80°C - Zellen für Optimierungsversuche

Für die Stammhaltung wurde ein Protokoll von Creavis - Science to Businesscenter (Evonik Degussa GmbH, Marl, Dtl.) zur Verfügung gestellt und modifiziert. Das in einer 10-L-Fed-Batch-Fermentation gewonnene und durch Zentrifugation (4000 x g, 4°C, 10 min, ZK 630, GHG Hermle, Wehingen, Dtl.) geerntete Zellpellet wurde in 2 L MRS-Medium mit 20 % DMSO resuspendiert, in Kunststoffvials (14 mL) aliquotiert und bis zur Verwendung bei -80°C gelagert.

Für eine Biotransformation wurden die benötigten Vials in einem Wasserbad aufgetaut (5 min, 37°C), in ein 50-mL-Kunststoff-Vial überführt, mit 0,1 M KPP pH 7 auf 50 mL aufgefüllt und zentrifugiert (4000 x g, 4°C, 10 min, Biofuge Stratos, Haereus/Thermo Fisher Scientific, Langenselbold, Dtl.). Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 50 mL Reaktionspuffer resuspendiert. Bei Bedarf erfolgte die Verdünnung der Zellsuspension mit dem Reaktionspuffer auf eine Zellkonzentration von 10^{10} Zellen/mL ($OD_{600} = 30$).

2.4 Immobilisierung

2.4.1 Einfluss von Glutardialdehyd bei der Quervernetzung der Zellbestandteile

Für die Immobilisierung wurde eine 2-L-Batch-Kultur geerntet und das Zellpellet mit 0,1 M KPP pH 5 auf 10^{10} Zellen/mL eingestellt. Von dieser Zellsuspension wurden jeweils 20 mL in anaerobisierte butylgummistopfenverschlossene 50-mL-Vials überführt und auf Eis gekühlt. Um den Sauerstoffeintrag in allen Ansätzen gleich zu halten, erfolgte die Zugabe von 2 mL eines aeroben Wasser-GDA-Gemisches, da die GDA-Lösung aufgrund des niedrigen Siedepunktes bzw. des hohen Dampfdruckes von GDA nicht durch Vakuum anaerobisiert werden konnte. Anschließend wurden alle Ansätze bei 400 rpm und 4°C für 16 Stunden gerührt. Nach der Temperierung der Suspensionen auf 35°C wurde die Überlebensrate nach der GDA-Behandlung bestimmt. Hierfür wurden verdünnte Zellsuspensionen (Verdünnung: 10^{-2} , 10^{-4} , 10^{-6}) auf MRS-Agar ausplattiert und unter anaeroben Bedingungen (Anaerobenbehälter, Dinkelberg Analytics, Gablingen, Dtl.) bei 37°C für 48 h inkubiert. Während des Ausplattierens (20 min) wurden die Zellsuspensionen für die Biotransformation bei 35°C temperiert. Zur Aktivitätsbestimmung wurde die Biotransformation durch die Zugabe von 2,5 mL 5 M Glycerinlösung (500 mM Endkonzentration) gestartet und ohne pH-Regelung stehend im 35°C-Wasserbad durchgeführt.

2.4.2 Immobilisierung von *L. reuteri* in LentiKats®

Für die Immobilisierung in LentiKats® (GeniaLab®, Braunschweig, Dtl.) wurde 1 L einer Batch-Kultur geerntet (Abschnitt 2.2.6) und das erhaltene, gewogene Zellpellet in der gleichen Menge (w/w) Puffer (0,1 M KPP pH 7) resuspendiert. Währenddessen wurden 80 mL LentiKat®-Liquid mit einem Magnetrührer in der Mikrowelle für 2 bis 4 min bei 800 W geschmolzen und bei Raumtemperatur unter Rühren bis zu einer Temperatur von ca. 35°C abgekühlt. Die Bakteriensuspension (20 mL) wurde mit 80 mL LentiKat®-Liquid vermischt und in einen Petrischalendeckel (ø 145 mm, Nalgene, Roskilde, Dänemark) überführt. Mit dem LentiKat®-Printer (Abb. 14 A) und weiteren vorab gewogenen Petrischalendeckeln wurden bis zu 400 gleiche LentiKats® pro Deckel gedruckt und die Immobilisate auf den offenen Deckeln unter dem Abzug mit Ventilation (Abb. 14 B) bis zu einer restlichen Gesamtmasse von 28 % getrocknet. Die Trocknungszeit lag bei 30-45 min und wurde durch die Zugabe von 10fachem Überschuss (w/v) LentiKat®-Stabilizer-Lösung abgestoppt. Bei der Rückquellung bildete sich die typische Linsenform aus. Um die maximale Stabilität zu erlangen und überschüssige Bestandteile auszuwaschen, wurden die Immobilisate für 1 h (wenn nicht anders vermerkt) bei Raumtemperatur und 200 rpm gerührt. In ersten Versuchen erfolgte dies unter aeroben Bedingungen (Abb. 14 C). Um die sauerstoffempfindlichen Zellen jedoch zu schützen, wurde daraufhin die Stabilisierung standardmäßig unter anaeroben Bedingungen in der Anaerobier Bank (Bactron IV, Sheldon, USA) durchgeführt (Abb. 14 D). Nach zweimaligem Spülen mit 0,1 M KPP pH 7,0 wurden 30-60 g LentiKats® (Feuchtmasse) in 1 L MRS-Medium (150 mM Glucose, 20 mM Glycerin) überführt und 16 h bei 33°C, stehend, unter mikroaeroben Bedingungen inkubiert.

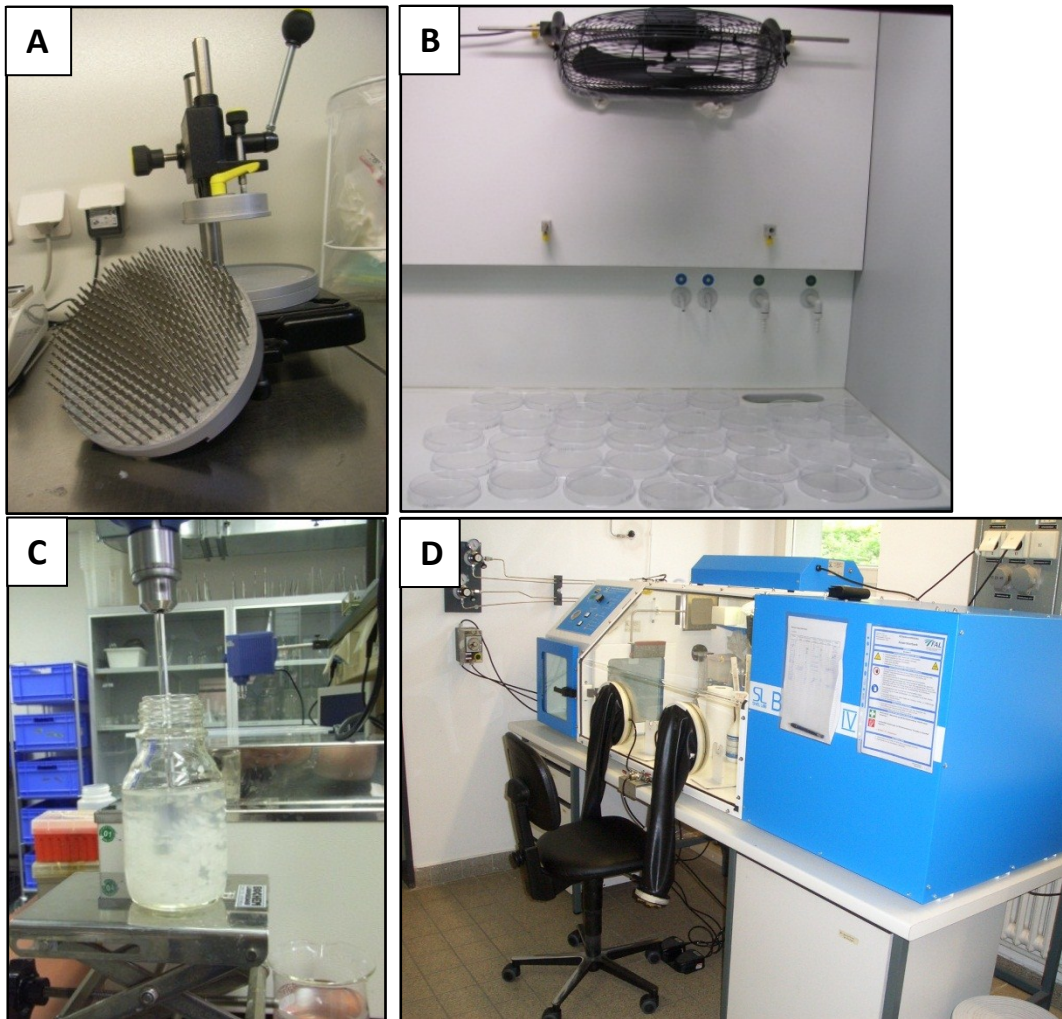


Abb. 14: **Herstellung von LentiKats[®]**; (A) LentiKat[®]-Printer, (B) aktive Trocknung der Immobilisate durch ein Gebläse, Stabilisierung unter (C) aeroben und (D) anaeroben (Anaerobier Bank Bactron IV, Sheldon, USA) Bedingungen

Nach der Regeneration wurden die Immobilisate durch ein Sieb vom Medium abgetrennt, zweimal mit 0,1 M KPP pH 7 unter aeroben Bedingungen gewaschen und zu 10 % (w/v) in einer Biotransformation im Doppelfermentersystem eingesetzt.

2.5 Biotransformation

Für alle Biotransformationsversuche wurde standardmäßig ein 0,1 M KPP verwendet. Dazu wurde eine 1 M Stammlösung von K_2HPO_4 und H_2KPO_4 hergestellt. Aufgrund der Hemmwirkung auf die GDHT wurde Natrium vermieden (Smiley und Sobolov, 1962) und ausschließlich Kalium als Gegenion verwendet. Für die Herstellung von 1 L 0,1 M KPP wurde in Abhängigkeit der weiteren Bestandteile 0,1 L der Säure (1 M) bei basischen (Carbohydrazid) oder 0,1 L der Base (1 M) bei sauren Komponenten (z.B. Semicarbazid/HCl) vorgelegt und auf 0,5 L mit destilliertem Wasser aufgefüllt. Nach Zugabe und Lösung aller weiteren Komponenten (z.B. Fängerstoffe) wurde der pH-Wert mittels KOH oder Phosphorsäure eingestellt und auf 1 L mit destilliertem Wasser aufgefüllt. Dieser Puffer wurde anaerobisiert und bei Raumtemperatur kurzzeitig gelagert. Das Substrat Glycerin wurde nicht dem Reaktionspuffer zugesetzt sondern direkt der Zellsuspension als Start der Biotransformation zugegeben.

2.5.1 Biotransformation ohne pH-Regelung

Die Biotransformation von Glycerin zu 3HPA erfolgte mit suspendierten Zellen von *L. reuteri* (Abschnitt 2.2.6) mit einer Zellkonzentration von 10^{10} Zellen/mL ($OD_{600} = 30$ bzw. 7 g BTM/L). In anfänglichen Versuchen ohne das Doppelfermentersystem wurde die Biotransformation stehend in Stickstoff begasten, Butylgummistopfen verschlossenen Vials ohne pH-Regelung durchgeführt. Die Temperierung erfolgte in einem Wasserbad und die Suspension wurde bei jeder anaeroben Probenahme mit Spritze und Kanüle durch Schütteln gemischt.

2.5.1.1 Einfluss der Lagerungstemperatur

Um den Einfluss der Temperatur während der Lagerung der Zellsuspension zu untersuchen, wurden 2 L einer gewachsenen Bakterienkultur geerntet und mit 0,1 M KPP pH 5 auf eine Zelldichte von $2 \cdot 10^{10}$ Zellen/mL eingestellt. Von dieser Suspension wurden jeweils 30 mL in einer mit Butylgummistopfen verschlossenen 200 mL Serumflasche unter Stickstoffatmosphäre bei 4°C, 22°C und 35°C stehend gelagert. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden jeweils 10 mL anaerob entnommen und in einer anaeroben Biotransformation stehend im Wasserbad, ohne pH-Regelung mit 500 mM Glycerin eingesetzt. Die Aktivitätsverläufe wurden anhand der gebildeten 3HPA-Menge innerhalb von 2 h berechnet. Um geringe Unterschiede der Zellsuspensionen zu kompensieren, wurde zu Beginn des Versuches die Aktivität auf 100 % normiert.

2.5.2 Biotransformation mit pH-Regelung

Bei der Verwendung des Doppelfermentersystems wurden die Reaktoren für anaerobe Bedingungen permanent mit Stickstoff begast und der pH-Wert mit 5 M KOH geregelt. Die Biotransformation von Glycerin zu 3HPA erfolgte unsteril mit suspendierten Zellen von *L. reuteri* (Abschnitt 2.2.6) mit einer Zelldichte von 10^{10} Zellen/mL ($OD_{600} = 30$ bzw. 7 g BTM/L) oder mit 10 % (w/v) LentiKat®-Immobilisaten (Abschnitt 2.4.2). Generell wurde, nachdem der pH-Wert und die Temperatur (standardmäßig pH 7 und 35°C) konstant verliefen, die Biotransformation mit Zugabe des Substrats Glycerin (500 mM Endkonzentration) bei 500 rpm gestartet. Die Zuführung von Lösungen bei Fed-Batch-Biotransformationen erfolgte anaerob über eine Kanüle mit einer Spritze. Bei Repeated-Batch-Biotransformationen wurde außerdem nach 150 min die Biotransformationsbrühe von den Immobilisaten abgetrennt und erneut das gleiche Volumen an temperiertem, anaerobisiertem Reaktionspuffer zugeführt. Die Probenahme (1 mL) erfolgte generell anaerob über eine Kanüle mit Absperrhahn und Spritze. Bei der Verwendung von LentiKats® wurde diese Kanüle zusätzlich mit einem Filter ausgerüstet, der die Immobilisate zurückhielt, währenddessen freie Zellen passieren konnten. Die Biomasse der Probe wurde durch Zentrifugation abgetrennt (20.800 x g, 4°C, 10 min, Centrifuge 5417 R, Eppendorf, Hamburg, Dtl.) und der Überstand jeweils in einer 10fachen Verdünnung zur HPLC-Analyse (Abschnitt 2.7.1.1) und in einer mindestens 100fachen Verdünnung zur 3HPA-Analyse im colorimetrischen Test (Abschnitt 2.7.3) eingesetzt.

2.5.2.1 Glucosezugabe für die Regenerierung des B₁₂-Koenzyms

Um den Einfluss von Glucose auf die Regeneration der GDHt und somit der 3HPA-Bildung zu untersuchen, wurden 2 L einer Bakterienkultur geerntet. Das erhaltene Pellet wurde mit 0,1 M KPP pH 5 auf eine Zelldichte von 10^{10} Zellen/mL eingestellt und unverzüglich im 0,2 L Maßstab im Doppelfermentersystem eingesetzt. Die Biotransformation erfolgte bei pH 5 (geregelt mit 5 M KOH) und 500 mM Glycerin. Im Fermenter 1 (F1) wurde erst nach 100 min Glucose (40 mM Endkonzentration) zugegeben. Im Fermenter 2 (F2) wurde zusätzlich bereits beim Start der Biotransformation Glucose (20 mM Endkonzentration) zugeführt.

2.6 Aktivitätsbestimmung der 3HPA-Bildung

Für die Bestimmung der Biotransformationsaktivität mit suspendierten Zellen oder LentiKats[®] wurde durch lineare Regression der 3HPA-Konzentration in den ersten 30 min der Biotransformation bestimmt [mM/min]. Mittels der Zellzahl-OD₆₀₀-BTM-Korrelation (Abschnitt 2.7.4) konnte für Zellsuspensionsversuche die spezifische Aktivität pro Biotrockenmasse bestimmt werden [μkat/g BTM]. Für die Berechnung der Volumenaktivität wurde die ermittelte spezifische Aktivität mit der Biotrockenmasse (Zelldichte) in der Fermentationsbrühe multipliziert [μkat/L]. Aufgrund der nur sehr grob abschätzbaren Zelldichte in den Immobilisaten wurde bei der Nutzung von LentiKats[®] nur die Biotransformationsaktivität ermittelt.

2.7 Analytik

2.7.1 Flüssigkeitschromatographie

2.7.1.1 Analytische Chromatographie

Zur quantitativen und qualitativen Analyse gelöster Stoffe wurde die High Performance Liquid Chromatography (HPLC) verwendet. Dazu wurden die zu untersuchenden zellfreien Proben 10fach mit destilliertem Wasser verdünnt. In Biotransformationsproben wurde das Substrat Glycerin und die Nebenprodukte 1,3-PDO und 3HP quantifiziert. In Fermentationsproben der Biomasseanzucht wurden darüber hinaus die organischen Säuren Acetat, Lactat und der Zucker Glucose vermessen. Für die Untersuchung des Substratspektrums in der Biotransformation von *L. reuteri* wurden zusätzlich Erythrit, Threitol, 1,2-Butanol sowie 1,2-PDO, 1-Propanol, Propionsäure, 1,2-EtOH und Ethanol bestimmt. Die erwarteten Zwischenprodukte Propanal und Ethanal konnten jedoch nicht verlässlich quantifiziert werden. Es wurde mit einem einzigen HPLC-System, das kontinuierlich verbessert wurde, gearbeitet. In Tab. 11 ist der letztendliche Stand dargestellt.

Tab. 11: Geräteliste des verwendeten HPLC-Systems

Gerät	Modell	Parameter	Hersteller
Autosampler	SIL-10AD-VP	10 µL Probenauftrag 50 µL Probenschleifen- volumen	Shimadzu, Duisburg, Dtl.
Controller	SCL-10A-VP	30 min Elutionszeit	
Pumpe 1	LC-10AT (50 %)	0,6 mL/min 5 mM H ₂ SO ₄ , isokratisch	
Pumpe 2	LC-20AT (50 %)		
Entgaser	DGU-3A		
Säulen-Ofen	CTO-10A	40°C	
Brechungsindex- Detektor	RID-10A	40°C-Zellentemperatur	
UV/Vis-Detektor	SPD-10A	210 nm	
Vorsäule	HPX-87H (30x4,6 mm)		Bio-Rad®, München, Dtl.
Säule	HPX-87H (300x7,8 mm)		
Datenerfassung	Class VP V7.4		Shimadzu, Duisburg, Dtl.

Aufgrund der Interaktion der verwendeten Fängerstoffe Carbohydrazid und Semicarbazid mit dem Säulenmaterial wurde die Vorsäule nach ungefähr 200 Proben ausgetauscht und für jeden Messdurchlauf eine neue Kalibrierung der einzelnen Stoffe angefertigt.

2.7.1.2 Schnelle Glucosebestimmung zur Fermentationsüberwachung

Bei Fed-Batch-Fermentationen wurde die Glucose-/Glycerin-Feed-Lösung verbrauchsabhängig zugegeben, wenn eine Konzentration von 50 mM Glucose unterschritten wurde. Die herkömmliche Glucosebestimmung erfolgte nach Abschnitt 2.7.1.1. Dabei konnte die Glucosekonzentration nach 10 min bei einer Gesamtmessdauer von 30 min ermittelt werden. Bei Doppelfermentationen bedeutete dies eine theoretische Verzögerungszeit von mindestens 40 min. Bei sehr starker Syntheseleistung der Bakterien, z.B. während des exponentiellen Wachstums, kann dies zu einem Substratmangel führen, der das Bakterienwachstum negativ beeinflussen würde. Die Verwendung zweier in Reihe geschalteter Vorsäulen sollte die Bestimmung der Glucose unter Inkaufnahme einer geringeren Genauigkeit deutlich verkürzen.

Für die Glucosebestimmung wurde die verwendete HPX-87H-Hauptsäule (300 x 7,8 mm) durch eine weitere Vorsäule (30 x 4,6 mm) ersetzt. Die Elutionsbedingungen blieben dabei unverändert (10 µL Probenvolumen, 40°C, 0,6 mL/min 5 mM H₂SO₄).

2.7.1.3 Präparative Chromatographie

Für weitere Analysen wurde das Produkt 3HPA aus einer fängerstofffreien Biotransformationsprobe präparativ manuell aus dem Eluentenstrom der HPLC abgetrennt. Hierfür wurde die 50 µL Probenschleife des Autosamplers gegen eine 1000 µL Probenschleife ausgetauscht, der Eluentenstrom direkt nach dem UV-Detektor manuell fraktioniert und in ≈100 µL Fraktionen aufgefangen (Abb. 15). Das injizierte Probenvolumen wurde dabei auf 500 µL bzw. 1000 µL erhöht. Der Start der Fraktionierung erfolgte nach 14,5 min bzw. nach dem Minimum zwischen dem Glycerin- und 3HPA-RID-Signal. Die einzelnen Fraktionen wurden mittels 200 µL Adapterhülsen für HPLC-Vials in der analytischen HPLC erneut vermessen. Aufgrund des Laufmittels (5 mM H₂SO₄) wurde das gewonnene 3HPA neutralisiert und für spätere Untersuchungen bzw. Verwendung bei 4°C gelagert.

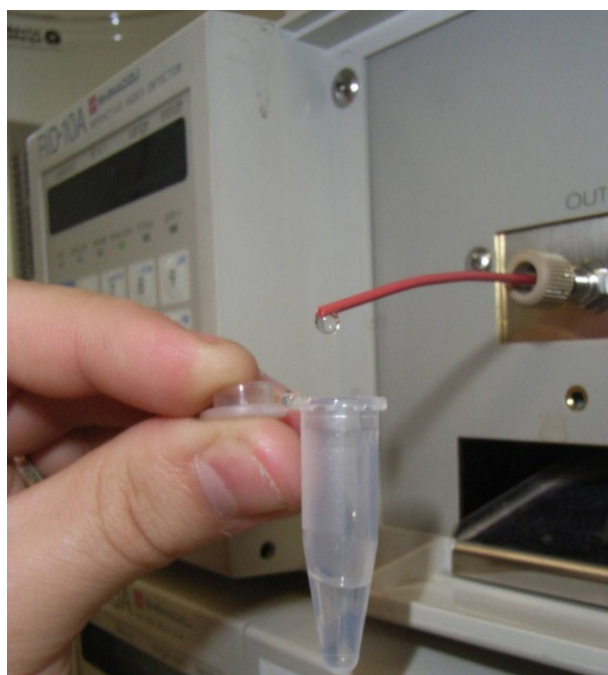


Abb. 15: **Manuelle Fraktionierung von 3HPA aus dem HPLC-Eluentenstrom**; 500 µL fängerstofffreie Biotransformationsprobe, HPX-87H-Vorsäule (30x4,6 mm), HPX-87H-Hauptsäule (300x7,8 mm), 40°C, 0,5 mL/min 5 mM H₂SO₄, 1000 µL Probenschleifenvolumen, Fraktionierung in 3 Tropfen ≈ 100 µL

2.7.2 Massenspektrometrie

Die Analyse von 3HPA und seiner Hydrazone mit Carbohydrazid wurden von Herrn Dipl. Ing. Dennis Jäger (Johann Heinrich von Thünen Institut Braunschweig, Abteilung Agrartechnologie) mit einem Applied Biosystems/ MDS Sciex QTRAP™ linear Ion Trap Massenspektrometer (AB Sciex, Darmstadt, Dtl.) durchgeführt, das mit einer Turbo Ion Spray® Quelle ausgestattet ist. Die Aufnahme der Massenspektren erfolgte im Bereich von 70-400 amu durch die Aufsummierung von 10 Spektren (Multi-Channel Acquisition) im positiven Q1 Scan Modus. Die Analyten wurden in einem Gemisch von 100 mM Ammoniumacetat und 10 % (v/v) Methanol verdünnt und direkt über eine angeschlossene Spritzenpumpe mit einer Fließrate von 10 µl/min eingespritzt. Diese Bedingungen wurden so gewählt, um eine spätere Kopplung an die HPLC zu ermöglichen. Die Quellenparameter waren: Ionspray voltage (IS) +5500V, declustering potential (DP) 80 V, entrance potential 10 V, curtain gas (CUR) 20, Turbo Ionen Spray Temperatur (TEM) 0, nebulizer gas (GS1) 20, auxiliary gas (GS2) 0. Eine Fragmentierung durch die ESI-MS Technik war nur in Spuren vorhanden. Im positiven Ionenmodus repräsentierten die Signale die positiv geladenen Protonen- $[M+H]^+$ und Ammonium-Addukte $[M+NH_4]^+$ von N-(3-Hydroxypropylaldehyd)-Carbohydrazon und N,N-di-(3-Hydroxypropylaldehyd)-Carbohydrazon.

2.7.3 Colorimetrischer Test zur 3HPA-Bestimmung

Die Quantifizierung des Produktes 3HPA erfolgte aufgrund der Interaktion der Fängerstoffe Carbohydrazid und Semicarbazid mit der HPX-87H Matrix in der HPLC ausschließlich über den nass-chemischen Test nach Circle et al. (1945).

Für den Test wurden die Proben mit destilliertem Wasser verdünnt, sodass die erwartete 3HPA-Konzentration 5 mM nicht überschritt. In Dreifachbestimmung wurden 200 µL dieser Lösung mit 150 µL Tryptophan-Lösung (10 mM DL-Tryptophan in 50 mM HCl) versetzt, die Reaktion mit 600 µL HCl (37 %) gestartet und die 1,5 mL Reaktionsgefäße im Wasserbad (37°C) 20 min inkubiert. Nach dem Abstoppen der Reaktion im Eisbad für 5 min wurde die Lösung in Küvetten (1 mL Kunststoffküvetten, Polystyrol, Sarstedt AG & Co, Nümbrecht, Dtl.) überführt und bei 560 nm die Absorption in einem Spektralphotometer (T-80, Tresser Instruments, Rossdorf, Dtl.) vermessen. Für die Korrelation der Absorption und der Acroleinkonzentration diente eine 0 mM - 5 mM Acrolein-Lösung in destilliertem Wasser. Diese wurde in regelmäßigen Abständen erneuert, da die Konzentration der rauchenden Salzsäure durch das Öffnen der Gebinde nicht konstant blieb.

2.7.4 Korrelationen OD₆₀₀-Zellzahl-BTM

Die optische Dichte diente bei einer Wellenlänge von 600 nm als schnell ermittelbare Kenngröße zur indirekten Bestimmung der zuvor korrelierten Zellzahl bzw. der Biotrockenmasse (BTM). Die Bestimmung der optischen Dichte erfolgte bei 600 nm in einem UV/Vis-Spektralphotometer (T-80, Tresser Instruments, Rossdorf, Dtl.). Als Referenz diente Luft ohne Küvette, da das optimierte Medium keinen signifikanten Einfluss auf die Messung hatte. Die Proben wurden mit destilliertem Wasser verdünnt, um im linearen Bereich des Photometers ($OD_{600} \leq 0,5$) zu messen. Die Zellzahl wurde mittels einer Thoma-Zählkammer am Mikroskop (Axioplan, Carl Zeiss AG, Oberkochen, Dtl.) bestimmt. Beides wurde miteinander korreliert (Abb. 16 A).

Zur Bestimmung der BTM wurden zwei -80°C-Aliquots bei 37°C 5 min inkubiert, mit 0,1 M KPP pH 7 auf je 50 mL aufgefüllt und bei 9200 x g, 4°C und für 15 min zentrifugiert (Biofuge Stratos, Haereus/Thermo Fisher Scientific, Langenselbold, Dtl.). Der erhaltene Überstand wurde verworfen, das Pellet in 20 mL 0,1 M KPP pH 7 resuspendiert und auf 50 mL aufge-

füllt. Von der vereinten Suspension wurde eine 1:2 Verdünnungsreihe mit je 50 mL hergestellt und die optischen Dichten bestimmt. Von den einzelnen Ansätzen wurden 40 mL zentrifugiert (9200 x g, 4°C, 20 min, Biofuge Stratos) und bei 105°C im Trockenschrank (UE 400, Memmert, Schwabach, Dtl.) bis zur Gewichtskonstanz getrocknet. Nach dem Abkühlen der Proben im Exsikkator auf Raumtemperatur wurde das Pellet-Gewicht mittels einer Analysenwaage (AnalyticA 200s, Sartorius, Göttingen, Dtl.) bestimmt, die BTM berechnet und mit der zuvor bestimmten optischen Dichte korreliert (Abb. 16 B).

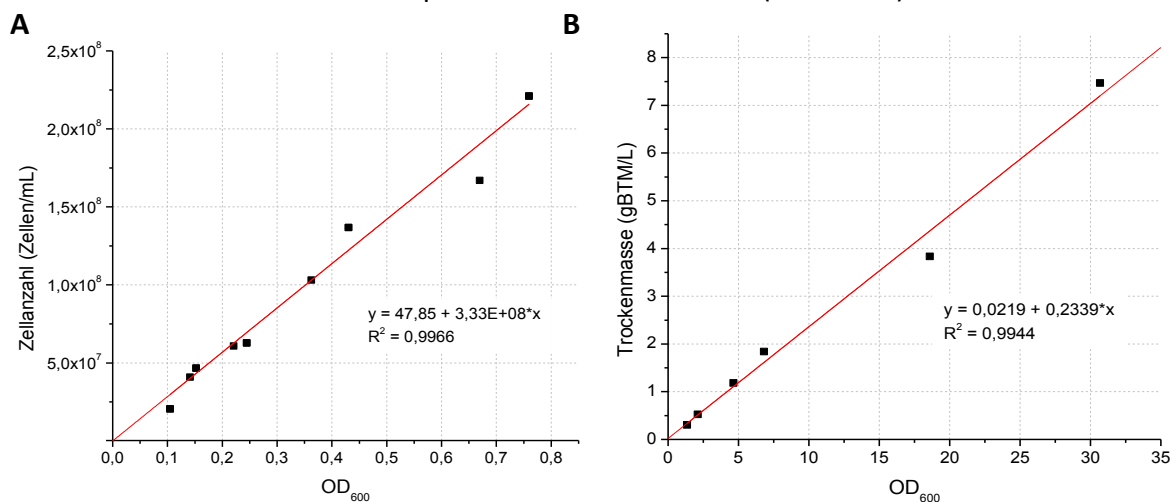


Abb. 16: **Biomassekorrelationen**; (A) Zellzahl und (B) BTM korreliert mit der optischen Dichte bei 600 nm

2.7.5 pK_B-Bestimmung der Fängerstoffe

Für die verwendeten Fängerstoffe Carbohydrazid und Semicarbazid sind nur wenige Literaturquellen der pK_S- oder pK_B-Werte in Wasser bekannt. Deshalb wurden diese mithilfe des Doppelfermentersystems bei 35°C in destilliertem Wasser bestimmt. In kurzen Zeitintervallen (10 sec) wurden vollautomatisiert 3 µL 1 M KOH bzw. 1 M HCl zu 20 mL einer 1 M Semicarbazid- bzw. Carbohydrazid-Lösung titriert. Um einen Einfluss des Titrationspaares HCl/KOH auszuschließen, wurde eine 1 M Carbohydrazid-Lösung mit einigen Tropfen konzentrierter HCl angesäuert und nur mit 1 M KOH titriert. Semicarbazid wurde analog dazu behandelt. Es wurde aufgrund des anfänglichen pH-Wertes (pH = 2) durch die Hydrochlorid-Form nur mit 1 M KOH titriert. Sowohl der pH-Wert als auch die Menge an verbrauchtem Titrationsmittel wurden aufgezeichnet und gegeneinander aufgetragen. Durch Regression mittels Origin Pro 8 (OriginLab, Northampton, USA) konnte der Wendepunkt bzw. der Halbäquivalenzpunkt, dem der pK_S-Wert entspricht, bestimmt werden. Der pK_B-Wert ermittelt sich aus Gleichung 1.

$$pK_S + pK_B = 14$$

Gleichung 1: Zusammenhang zwischen der Säure- und Basenkonstante

2.7.6 Sauerstoffentfernung der Fängerstoffe in Wasser

Zur Bestimmung der Geschwindigkeit der Sauerstoffentfernung aus wässrigen Lösungen wurde der Doppelfermenterstand mit einem temperierbaren Doppelwand-Glasreaktor (74 mL) ausgestattet und mit einem Polytetrafluorethylen (PTFE)-beschichtetem Butylgummiseptum verschlossen, sodass ein Eindringen von äußerem Sauerstoff minimiert wurde. In diesem Reaktor waren nur ein Magnetrührer, die Sauerstoff-Optode und der dazugehörige Temperaturfühler (Tab. 6) integriert (Abb. 17).

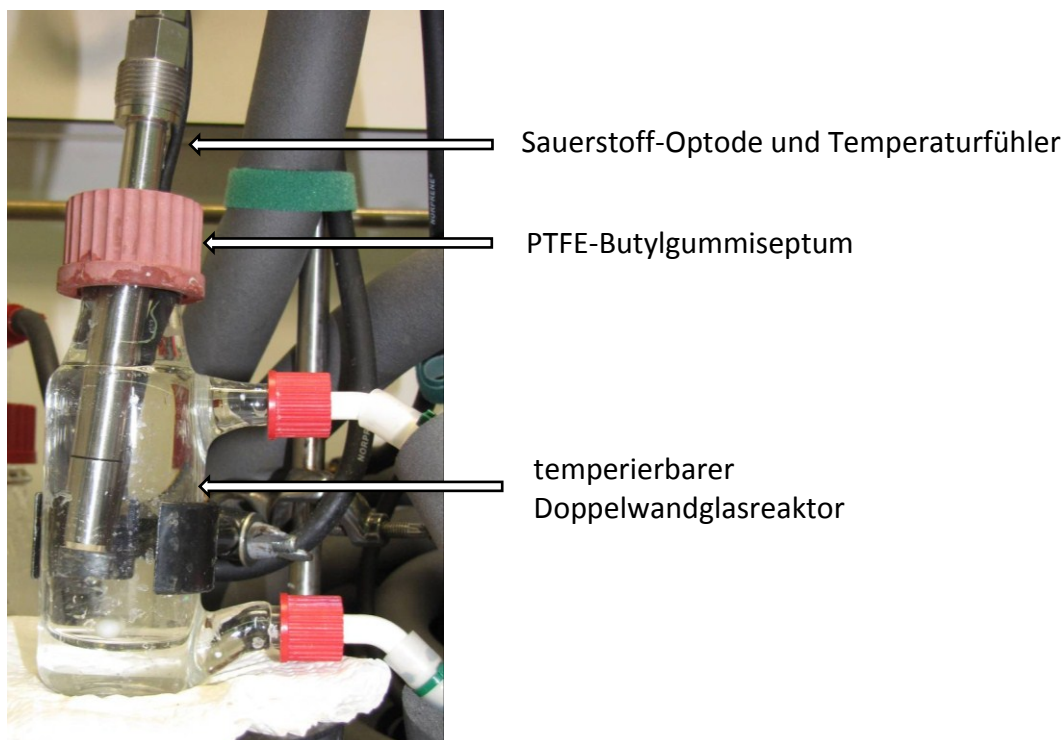


Abb. 17: **Bestimmung der Sauerstoffentfernung durch Carbohydrazid und Semicarbazid in wässrigen Medien;** temperierbarer, luftdichter Minireaktor mit optischer Sauerstoffmessung (Fibox 3, OIM-PSt3-D12/L120-L2.5, Presens, Regensburg, Dtl.)

Die temperaturkompensierte Kalibrierung der Sauerstoff-Optode erfolgte mit Wasserdampf gesättigter Luft (100 %) und mit zuvor durch Natriumdithionit reduziertem Wasser (0 %) bei 22°C. Nachdem 74 mL destilliertes Wasser in dem Reaktor eine konstante Temperatur (25°C-50°C) erreicht hatten (500 rpm), wurde Carbohydrazid bzw. Semicarbazid (500 mM Endkonzentration) zugegeben und der Reaktor sofort verschlossen. Bei der Maximalbefüllung des Reaktors wurde eine minimale Gasblase gebildet, die mit einer Verschiebung der Optode in den Reaktor und dem dabei entstehenden Überdruck durch die Dichtung entfernt wurde. Die Datenaufnahme erfolgte alle 10 sec und als Maß der Sauerstoffentfernung diente der lineare Bereich nach Zugabe des Carbohydrazids.

2.8 Chemikalienliste

Chemikalie	Hersteller	Reinheit
3-Hydroxypropionsäure	TCI Deutschland GmbH, Eschborn, Dtl.	33 %
Acrolein	Sigma-Aldrich, Steinheim, Dtl.	≥95 %
Carbohydrazid	Sigma-Aldrich, Steinheim, Dtl.	98 %
Fleischextrakt	Carl Roth, Karlsruhe, Dtl.	für die Mikrobiologie
Glucose-Monohydrat	Carl Roth, Karlsruhe, Dtl.	für die Mikrobiologie
Glycerin	Carl Roth, Karlsruhe, Dtl.	≥98 %
Hefeextrakt	Merck KGaA, Darmstadt, Dtl.	für die Mikrobiologie
K ₂ HPO ₄	Carl Roth, Karlsruhe, Dtl.	≥99 %
KH ₂ PO ₄	Carl Roth, Karlsruhe, Dtl.	≥99 %
LentiKat [®] -Liquid	GeniaLab [®] , Braunschweig, Dtl.	-
LentiKat [®] -Stabilizer	GeniaLab [®] , Braunschweig, Dtl.	-
Pepton aus Casein	Carl Roth, Karlsruhe, Dtl.	für die Mikrobiologie
Salzsäure	Merck KGaA, Darmstadt, Dtl.	37 % - rauchend
Schwefelsäure	Sigma-Aldrich, Steinheim, Dtl.	Fixanal 0,5 M
Semicarbazid * HCl	Alfa Aesar, Karlsruhe, Dtl.	99 %

3. Ergebnisse

3.1 Optimierung der Zellanzucht

Zur Anzucht von *L. reuteri* wurden die Bakterien in einer halbgeöffneten maximal mit Medium gefüllten Schraubdeckelflasche bei 37°C für 18 h stehend inkubiert. Es zeigten sich starke Schwankungen in der Biomasseherstellung und in der Biotransformationsaktivität. Deshalb wurde die Anzucht der aktiven Biomasse untersucht und optimiert.

3.1.1 Optimierung des Mediums

Die Kultivierung von *L. reuteri* erfolgte anfänglich mit kommerziell erhältlichem MRS-Komplettmedium, das 12 min bei 121°C und 1 bar autoklaviert wurde. Unter diesen Bedingungen kam es unter anderem durch Maillard-Reaktionen zu einer verstärkten Verfärbung des Mediums. Um sowohl eine Beeinflussung der photometrischen Zelldichtemessungen als auch eine negative Auswirkung der Nebenprodukte und der Nährstoffverfügbarkeit im Medium zu verhindern, wurde das Bakterienwachstum auf kommerziellem Komplettmedium und separat hergestelltem Medium untersucht. Bei letzterem erfolgte die Zugabe der getrennt autoklavierten Glucose nach dem Autoklavieren des Mediums.

Für diesen Versuch wurden aus einer gut gewachsenen Vorkultur jeweils 2 %ig die verschiedenen Medien angeimpft und nachfolgend bei 37°C das Wachstum mittels optischer Dichte sowie der pH-Wert beobachtet (Abb. 18).

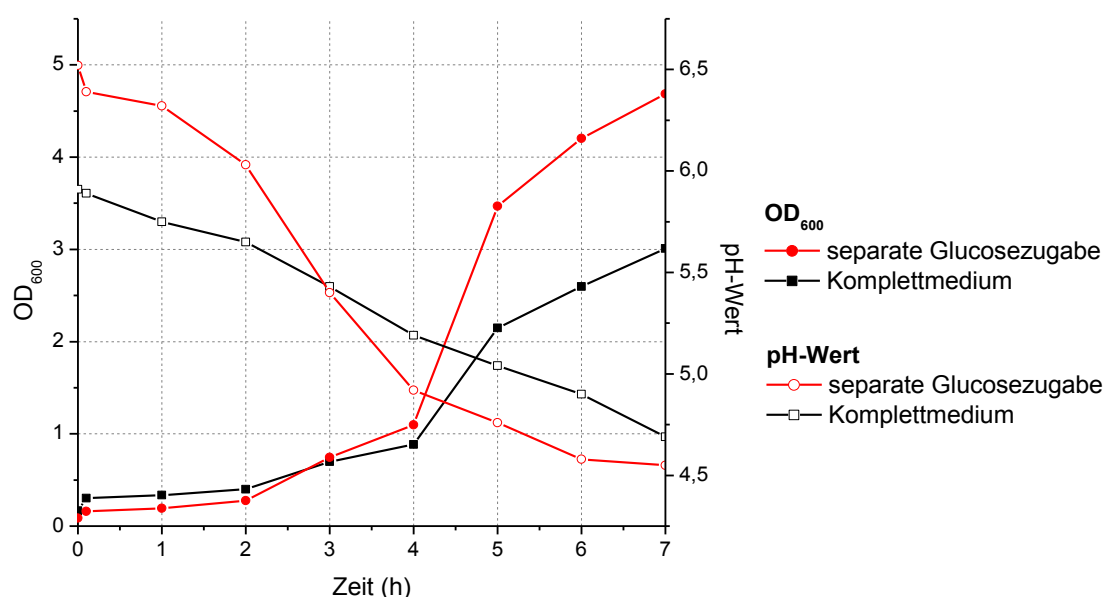


Abb. 18: **Optimierung der Mediumherstellung;** Wachstumsverlauf von *L. reuteri* in MRS-Komplettmedium und Medium mit separater Glucosezugabe nach dem Autoklavieren (2 % Inokulum, 37°C, pH ungeregelt, nicht geschüttelt, mikroaerob)

Infolge der separaten Glucosezugabe konnte die tiefbraune Verfärbung des Mediums vollständig verhindert werden. Außerdem wurde in dieser parallelen Batch-Fermentation gezeigt, dass sich die Wachstumsbedingungen deutlich verbessert haben und eine höhere Zelldichte mit einem schnelleren Wachstum erreicht werden konnte (Abb. 18). Aufgrund der besseren Biomasseproduktion wurde nachfolgend das MRS-Medium selbst hergestellt und die Glucosezugabe erfolgte separat nach dem Autoklavieren.

3.1.2 Sauerstoffeinfluss während der Zellanzucht

Obwohl das Batch-Medium zur Biomasseanzucht optimiert wurde, kam es bei der aeroben/mikroaeroben Anzucht von *L. reuteri* zu einer nicht reproduzierbaren 3HPA-Bildung im nachfolgenden Biotransformationsschritt. Für eine optimale Kultivierungsstrategie wurden sowohl aerobe, mikroaerobe als auch anaerobe Kultivierungsbedingungen untersucht.

Aus einer gut gewachsenen anaeroben Vorkultur (Abschnitt 2.2.3) wurde die Biomasse unter anaeroben, mikroaeroben und aeroben Bedingungen inkubiert, das Wachstum über die optische Dichte verfolgt und zusätzlich die Konzentration von Glucose, Glycerin und 1,3-PDO gemessen (Abb. 19).

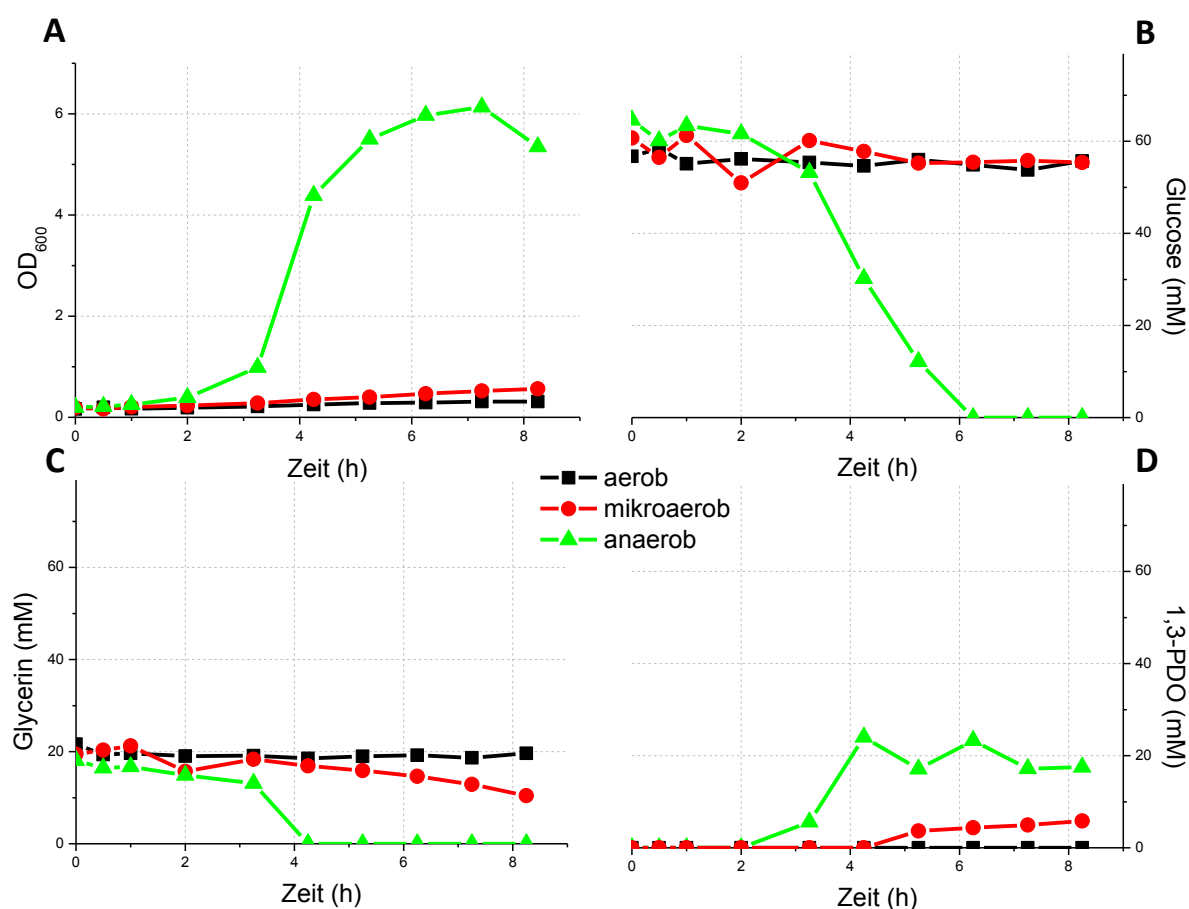


Abb. 19: **Sauerstoffeinfluss auf das Wachstum von *L. reuteri***; (A) Glucose-, (B) Glycerin-Verbrauch, (C) optische Dichte, (D) 1,3-Propandiol-Bildung, aerobe Bedingungen: geschüttelte halboffene Inkubation, mikroaerobe Bedingungen: nicht geschüttelte halboffene Inkubation, anaerobe Bedingungen: anaerobisierte Medien/Gebinde sowie geschüttelte, geschlossene Inkubation (1 % Inokulum, 37°C, pH unregelt)

Im untersuchten Zeitraum erfolgte das beste Wachstum von *L. reuteri* unter anaeroben Bedingungen, hierbei wurden Glucose und Glycerin vollständig umgesetzt. Unter mikroaeroben Bedingungen konnte kaum ein Wachstum beobachtet werden, wobei Glycerin bereits in geringen Mengen zu 1,3-PDO umgesetzt wurde. Die optische Dichte stieg im beobachteten Zeitraum nur geringfügig an. Währenddessen konnte unter aeroben Kultivierungsbedingungen im Beobachtungszeitraum kein Wachstum oder Substratverbrauch erkannt werden (Abb. 19). Aufgrund dieser Ergebnisse wurde eine Anaerobisierungsanlage (Abschnitt 2.2.3) aufgebaut und die weitere Biomasseanzucht ausschließlich anaerob durchgeführt.

3.1.3 Enzymaktivität in einer Batch-Fermentation

Durch die neue, angepasste Kultivierung und die Veränderung einzelner Parameter wie Temperatur, Medienbeschaffenheit und Durchmischung musste der optimale Erntezeitpunkt für die GDHt-aktive Biomasse überprüft werden.

Es wurde 1 L anaerobes MRS-Medium (100 mM Glucose, 20 mM Glycerin) in einer 2-L-Schraubdeckelflasche mit 1 % Inokulum anaerob bei 37°C und 80 rpm inkubiert, zu unterschiedlichen Zeitpunkten jeweils 0,2 L Probe anaerob entnommen und die sofort geerntete Biomasse mit 0,1 M KPP pH 6 auf eine Zelldichte von 10^{10} Zellen/mL eingestellt (Abschnitt 2.2.6). Direkt im Anschluss wurden jeweils 5 mL dieser Suspension in einer pH-ungeregelten Biotransformation ohne Fängerstoff eingesetzt (Abschnitt 2.5.1) und sowohl die spezifische als auch die Volumenaktivität bestimmt (Abb. 20).

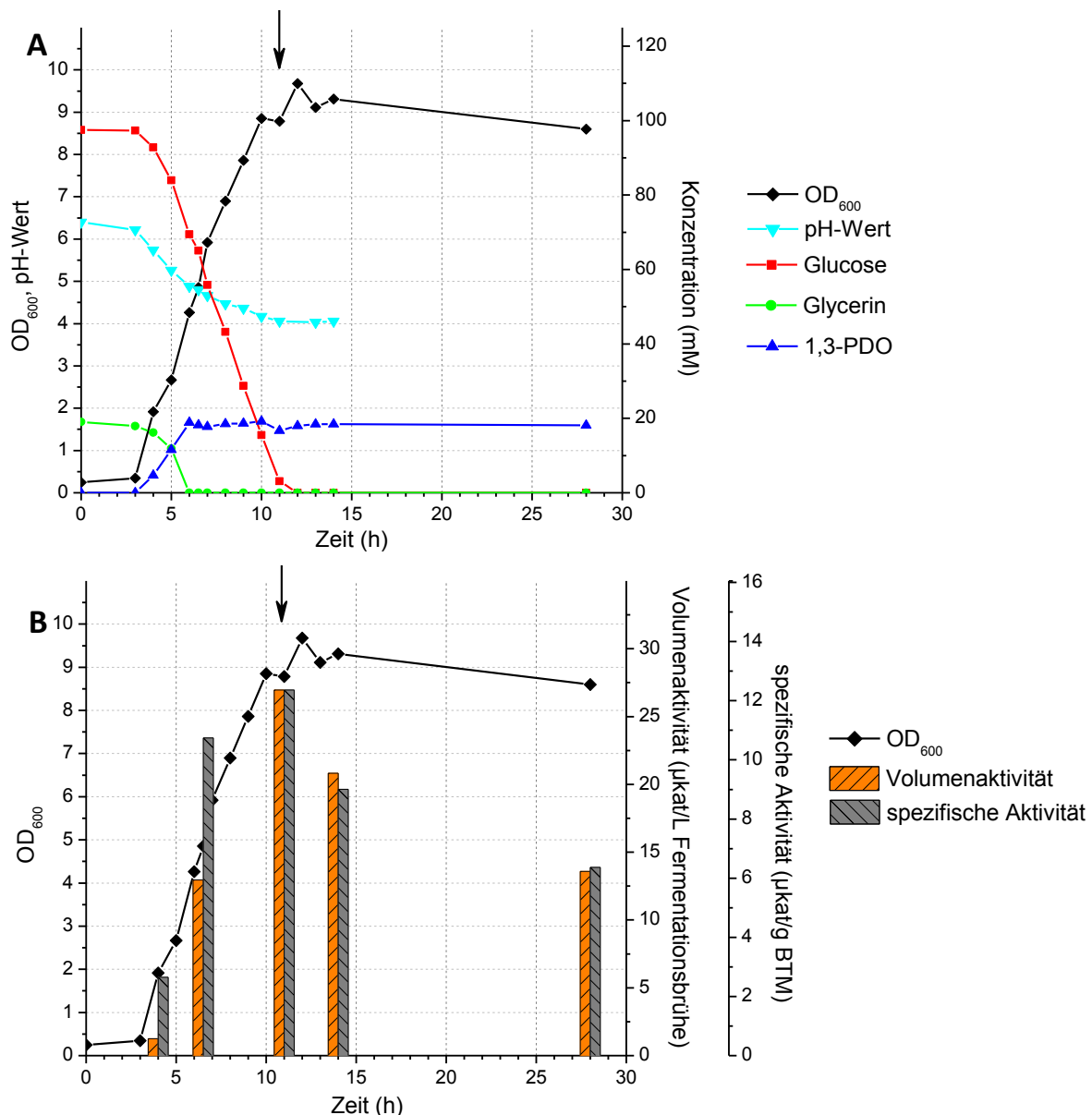


Abb. 20: **Abhängigkeit der Aktivität von der Wachstumsphase von *L. reuteri* in einer 1-L-Batch-Fermentation;** (A) Wachstums- und Metabolitverlauf (37°C, pH-ungeregelt, 80 rpm, anaerob), (B) Aktivität der Ganzzellkatalysatoren in der Biotransformation (10^{10} Zellen/mL, ohne Fängerstoff, 35°C, pH 6, 500 rpm, anaerob), idealer Erntezeitpunkt: 11 h (Pfeil)

Nach 6 h hatte die spezifische Aktivität bereits fast das Maximum erreicht, jedoch war die Zelldichte zu diesem Zeitpunkt noch zu gering, um einen deutlichen Einfluss auf die Volumenaktivität der Fermentationsbrühe auszubilden. Die höchste spezifische und Volumenaktivität wurde nach 11 h am Ende der exponentiellen Wachstumsphase bestimmt und stellt somit den idealen Erntezeitpunkt einer Batch-Fermentation bei 37°C dar. Nach dem vollständigen Substratverbrauch wechselte die Kultur in die stationäre bzw. Absterbephase und die Aktivität der Zellen sank schnell ab (Abb. 20).

Aufgrund des raschen Absinkens der Aktivitäten sollte in weiteren Versuchen überprüft werden, ob die Aktivität durch die Substratzugabe in einer Fed-Batch-Fermentation erhalten werden kann.

3.1.4 Einfluss verschiedener Suppline auf die Fed-Batch-Kultivierung

Durch die kontinuierliche Zugabe von Glucose und Glycerin zeigte sich in einer ersten Fed-Batch-Biomasseanzucht kein zusätzliches Wachstum. Um eine Mangelercheinung durch fehlende Medienkomponenten auszuschließen, wurden diese einzeln bzw. in Kombination untersucht.

Für die Biomasseanzucht mit einer gekoppelten Zugabe der Substrat- und Supplinlösung wurden die Feedpumpen des Doppelfermenterstandes mit einer Doppelschlauchkassette ausgerüstet (Abschnitt 2.2.4). Dadurch konnten neben den komplexen Medienbestandteilen Pepton, Fleischextrakt und Hefeextrakt auch eine Spurenelemente- (DSM 141) und eine Vitaminlösung (DSM 141) zeitgleich mit dem Substrat zugegeben werden (Abb. 21).

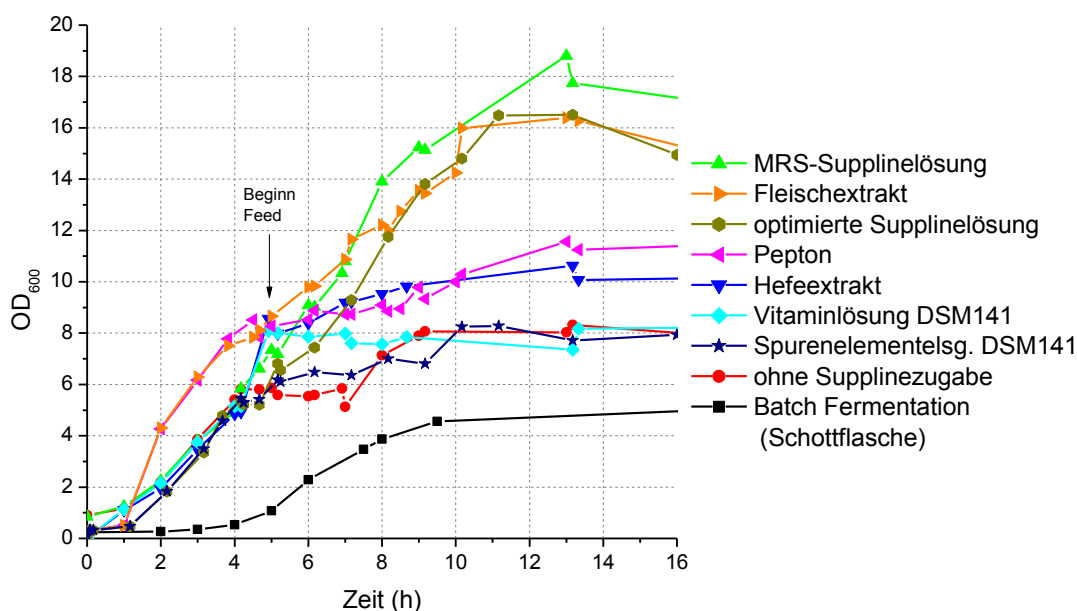


Abb. 21: **Optimierung der Biomasseproduktion in der Fed-Batch-Fermentation bei pH 7**; Einfluss verschiedener Supplinlösungen auf die optische Dichte, Zugabe gekoppelt an den Glucosefeed, Beginn Feed ab 5 h, Fed-Batch-Fermentation (200 mL, 3 % Inokulum, 37°C, pH 7, 500 rpm, anaerob), Batch-Fermentation (1000 mL, 1 % Inokulum, 37°C, pH 6,2, 80 rpm, anaerob)

Es zeigte sich bei der Zugabe der MRS-Suppline (Tab. 8) eine deutliche Erhöhung der Zelldichte auf $OD_{600} = 18,8$. Daraufhin wurde der Einfluss der einzelnen Bestandteile näher untersucht. Während Fleischextrakt den größten Einfluss auf die Zelldichte hatte und Pepton und Hefeextrakt nur zu einer geringfügigen Erhöhung der Zellkonzentration führten, zeigte die Zugabe einer für Anaerobier typischen Vitamin- oder Spurenelementelösung keinen positiven Einfluss auf das Zellwachstum (Abb. 21).

Resultierend aus diesen Ergebnissen wurde eine optimierte Supplinzelösung mit stark reduziertem Pepton- und Hefeextraktanteil abgeleitet und erfolgreich ($OD_{600} = 16,5$) getestet (Abb. 21). Im Vergleich zur Zellanzucht im Batch-Verfahren konnte die Zelldichte um das 2,8fache und im Vergleich zur Fed-Batch-Fermentation ohne Supplinelösung um das 2,3fache gesteigert werden (Abb. 21).

Alle Fermentationen zur Optimierung der Fed-Batch-Biomasseanzucht erfolgten bei pH 7 (geregelt mit 10 M KOH). In einer 8-L-Fermentation (Abschnitt 2.2.5) konnte eine zusätzliche Erhöhung der Zelldichte um das 1,5fache durch die Regulation des pH-Wertes auf 5,5 nach Doleyres et al. (2005) erreicht werden (Abb. 22).

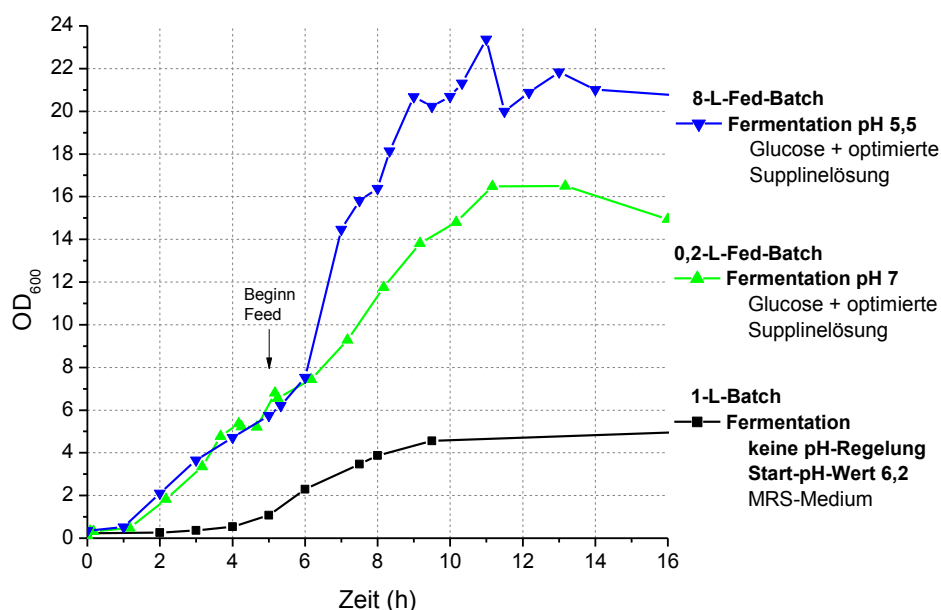


Abb. 22: Einfluss des pH-Wertes auf das Wachstum von *L. reuteri*; 8-L-Fed-Batch (3 % Inokulum, 37°C, 100 rpm, anaerob, Beginn Feed ab 5 h), 0,2-L-Fed-Batch (3 % Inokulum, 37°C, 500 rpm, anaerob, Beginn Feed ab 5 h), 1-L-Batch (1 % Inokulum, 37°C, 80 rpm, anaerob, Schraubdeckelflasche)

Aufgrund dieser Ergebnisse wurde in folgenden Fermentationen der pH-Wert auf pH 5,5 geregelt und im Fed-Batch-Verfahren die optimierte Supplinzelösung verwendet.

3.1.5 Enzymaktivität in einer Fed-Batch-Fermentation

Während der Fed-Batch-Fermentation wurde die optimierte Supplinzelösung an die Substratfütterung gekoppelt. Durch diese Veränderung musste die Aktivität der Zellen analog zu Abschnitt 3.1.3 bestimmt werden, um den idealen Erntezeitpunkt neu festzulegen. Des Weiteren sollte dabei die Frage geklärt werden, ob die Zellaktivität durch die Zugabe von weiterem Substrat erhalten werden kann.

Die Fed-Batch-Kultivierung erfolgte nach Abschnitt 2.2.5 im 8-L-Maßstab mit der optimierten Supplinemischung. Es wurde zu unterschiedlichen Zeitpunkten jeweils 1 L Probe anaerob entnommen und die Zellen durch Zentrifugation sofort geerntet. Die Resuspension der Biomasse erfolgte in 0,1 M KPP pH 7 mit 520 mM Carbohydrazid auf eine Zelldichte von 10^{10} Zellen/mL. Anschließend wurden unverzüglich jeweils 50 mL dieser Suspensionen in einer Biotransformation mit 500 mM Glycerin im Doppelfermentersystem mit dem Fängerstoff Carbohydrazid (520 mM) eingesetzt und die Biotransformationsaktivität bestimmt (Abb. 23).

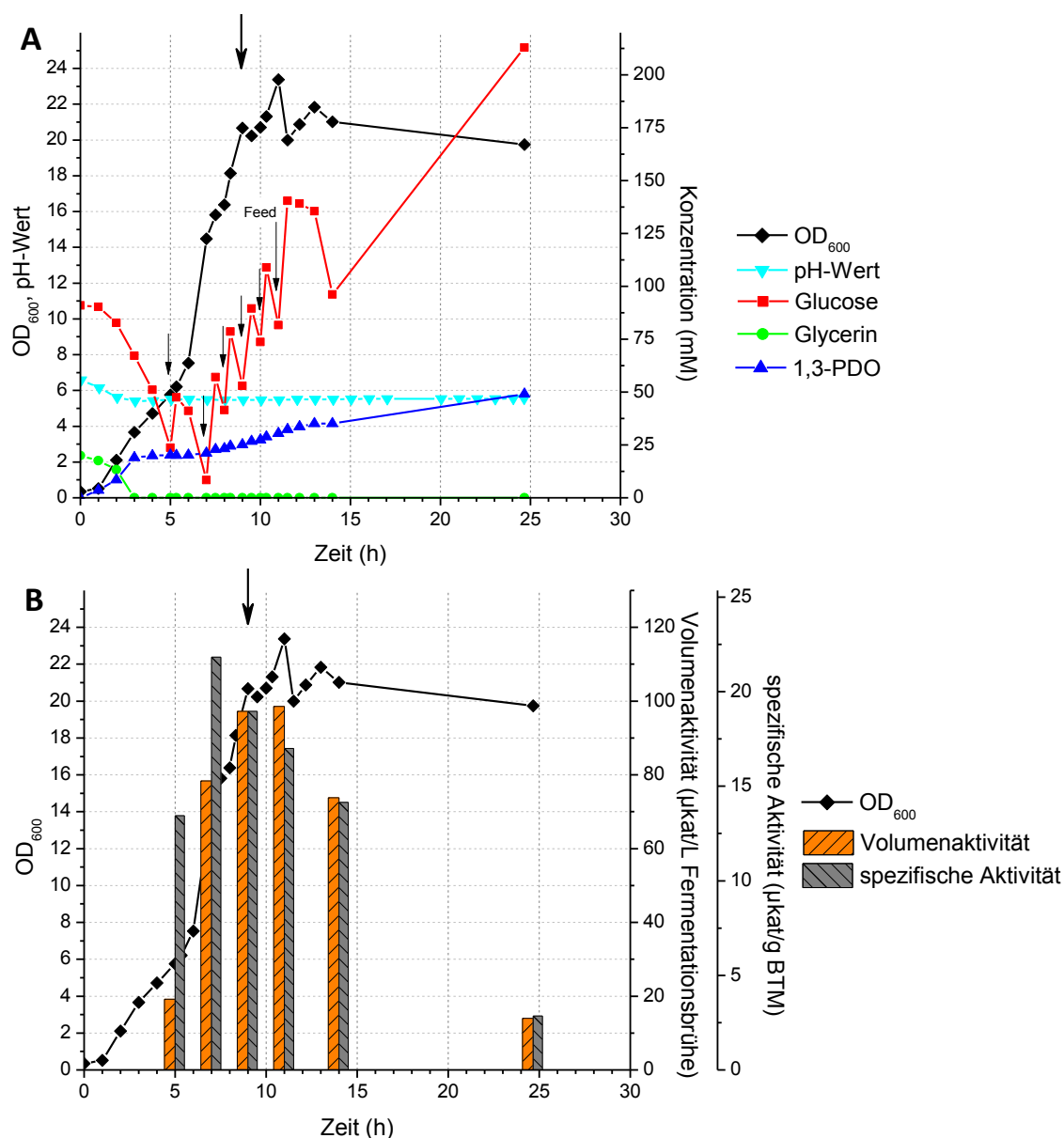


Abb. 23: **Abhängigkeit der Aktivität von der Wachstumsphase von *L. reuteri* im 8-L-Fed-Batch**; (A) Wachstums- und Metabolitverlauf (37°C, pH 5,5, 100 rpm, anaerob), (B) Aktivitäten der Ganzzellkatalysatoren in der Biotransformation (10^{10} Zellen/mL, 520 mM Carbohydrazid, 35°C, pH 7, 500 rpm, anaerob), idealer Erntezeitpunkt 9 h (Pfeil)

Im Vergleich zur Batch-Kultivierung (Abschnitt 3.1.3) zeigte sich ein vergleichbares Verhalten der Zellen. In der exponentiellen Wachstumsphase wurde die höchste spezifische Aktivität nach 7 h erreicht, während die Volumenaktivität am Ende der exponentiellen Wachstumsphase nach 9-11 h ein Maximum aufwies. Trotz der ausreichend vorliegenden Substratmenge sanken in der stationären bzw. Absterbephase die Aktivitäten rapide ab (Abb. 23). Für die Gewinnung aktiver Biomasse sollte demzufolge die Ernte in der Fed-Batch-Fermentation bei 37°C nach 9 h erfolgen, da zu diesem Zeitpunkt die höchste Volumenaktivität erzielt werden konnte, während bei 11 h die spezifische Aktivität deutlich gesunken war.

3.2 Biotransformation mit *Lactobacillus reuteri* ohne Fängerstoffzugabe

Zur Optimierung der 3HPA-Herstellung wurden zunächst grundlegende Einflüsse untersucht und der Biotransformation keine Fängerstoffe zugesetzt.

3.2.1 Temperaturabhängiger Aktivitätsverlust gelagerter Zellsuspensionen

Durch die Lagerung der suspendierten Zellen bei physiologischen Temperaturen können zellinterne biologische Abbauprozesse begünstigt werden. Um diesen Einfluss zu beurteilen, wurden Zellsuspensionen von *L. reuteri* in KKP bei der Biotransformationstemperatur (35°C), Raumtemperatur (22°C) und 4°C näher untersucht.

Die bereits auf eine Zellkonzentration von 10^{10} Zellen/mL eingestellten Zellsuspensionen wurden bei verschiedenen Temperaturen gelagert, nachfolgend in einer Biotransformation eingesetzt (Abschnitt 2.5.1.1) und die spezifische Aktivität bestimmt (Abb. 24).

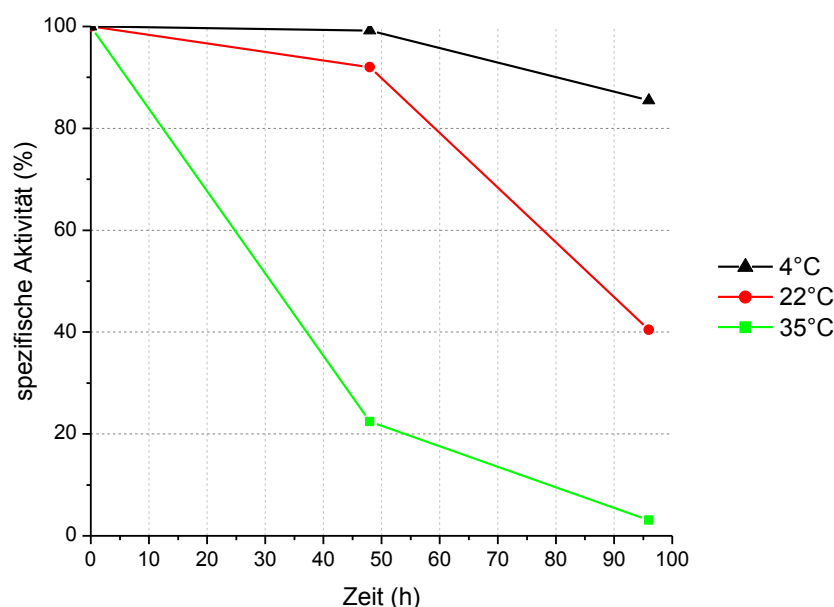


Abb. 24: Lagerungsbedingter Aktivitätsverlust von Zellsuspensionen bei unterschiedlichen Temperaturen; anaerobe Lagerung pH 7-gepufferter Zellsuspensionen von *L. reuteri* bei 4°C, 22°C und 35°C, Biotransformation: $2 \cdot 10^{10}$ Zellen/mL, ohne Fängerstoff, 35°C, pH 5 - ungeregelt, anaerob

Mit steigender Lagerungstemperatur zeigte sich ein verstärkter Aktivitätsverlust der Zellen. Bei 35°C ein besonders starker Aktivitätsverlust zu beobachten, indes nach 10 h ein Aktivitätsverlust von bereits 20% erfolgte. Dem entgegen blieb für 2 Tage bei 4°C die Aktivität stabil, während bei 22°C ein Verlust von 8% erfolgte (Abb. 24).

3.2.2 Langzeitaktivitätsstabilisierung durch Quervernetzung der Zellbestandteile

Für die Untersuchung des GDHt-Abbaus durch Proteasen soll eine Quervernetzung der Zellbestandteile durch GDA diesen Abbau unterbinden. Dabei werden durch die polymeren Strukturen von GDA und deren reaktive Aldehydgruppen die Zellbestandteile unspezifisch kovalent gebunden und ein Netzwerk ausgebildet. Durch dieses starre Netzwerk an Zellkomponenten werden Proteasen räumlich von der GDHt getrennt und dadurch ein Abbau verhindert. Hierbei dient die Überlebensrate als Indikator für eine erfolgreiche Quervernetzung, da bei steigender unspezifischer Quervernetzung zunehmend physiologische Prozesse unterbunden werden und somit die Überlebensrate der Bakterien sinkt.

Für diesen Versuch wurden Zellsuspensionen von *L. reuteri* für 16 h GDA bei 4°C ausgesetzt. Aufgrund der Ergebnisse aus Abschnitt 3.2.1 war der Aktivitätsverlust der Zellen bei der 4°C-Lagerung vernachlässigbar. Somit konnte der GDA-Einfluss bei diesen Temperaturen untersucht werden (Abb. 25).

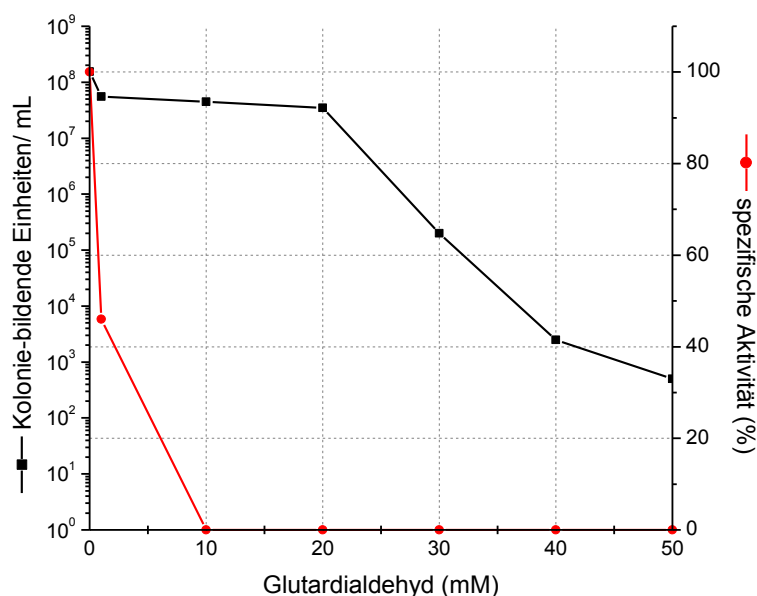


Abb. 25: **Quervernetzung von *L. reuteri* durch Glutardialdehyd**; Einfluss der Glutardialdehydkonzentration auf die Überlebensrate und die spezifische Aktivität in der Biotransformation (10¹⁰ Zellen/mL, ohne Fängerstoff, 35°C, pH ungeregt, anaerob)

Erst ab einer Konzentration von 20 mM hatte GDA einen signifikanten Einfluss auf die Überlebensrate von *L. reuteri* (Kolonie-bildende Einheiten). Dem entgegen gingen bereits bei einer GDA-Konzentration von 1 mM über 50 % der spezifischen Aktivität verloren, während 10 mM GDA zu einem vollständigen Aktivitätsverlust der GDHt führen (Abb. 25).

Dies offenbart die hochempfindliche Reaktion der GDHt mit bereits sehr geringen Konzentrationen GDA, das zur vollständigen Inaktivierung führt.

3.2.3 Glucosezugabe für die Regenerierung des B₁₂-Koenzyms

Glucose ist ein natürliches Substrat von *L. reuteri*, dass der Bakterienzelle im Katabolismus Energie (ATP) und Reduktionsäquivalente (NAD(P)H) zur Verfügung stellt. Diese werden unter anderem genutzt, um die inaktivierte GDHt zu reaktivieren. Da die Biotransformation ein wachstumsentkoppelter Prozess ist, wurde der Einfluss einer geringen Menge Glucose untersucht.

Die verwendete Zellsuspension wurde nach Abschnitt 2.5.2.1 hergestellt und auf beide Bioreaktoren verteilt. Während in beiden Fermentern die Glucosezugabe nach 100 min erfolgte, wurde in Fermenter 2 zusätzlich bei dem Start der Biotransformation Glucose zugeführt (Abb. 26).

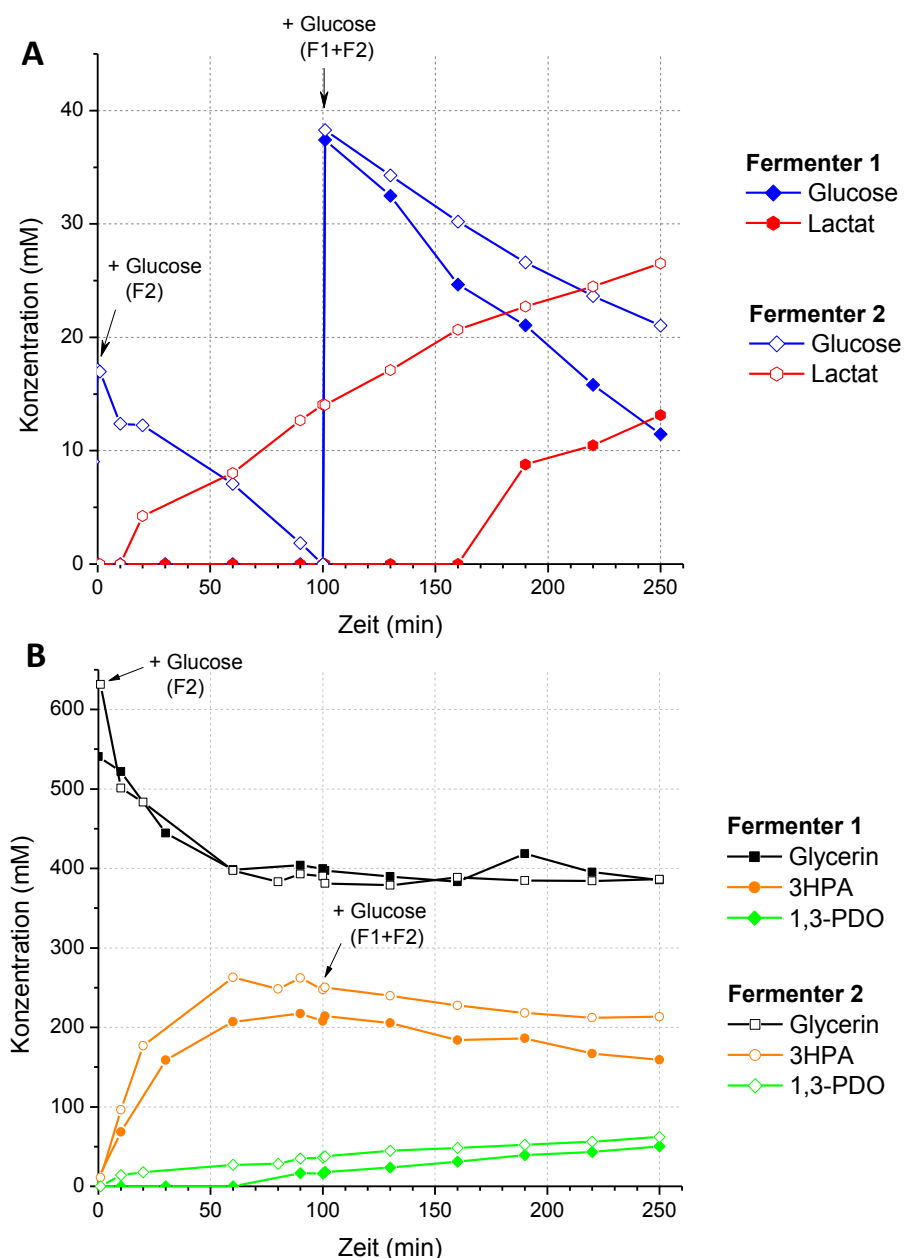


Abb. 26: **Einfluss der Glucosezugabe während der Biotransformation**; Zugabe von Glucose in Fermenter 1 nach 100 min, in Fermenter 2 nach 0 min und 100 min, (A) Verlauf von Glucose und Lactat, (B) Metabolitverlauf von Glycerin, 3HPA und 1,3-PDO (10^{10} Zellen/mL, ohne Fängerstoff, 35°C, pH 5, 500 rpm, anaerob)

In beiden Ansätzen konnte unabhängig vom Glucosezugebezeitpunkt eine 1,3-PDO- (Abb. 26 A) und eine Lactatbildung (Abb. 26 B) beobachtet werden, wobei die 1,3-PDO-Zunahme ungefähr der 3HPA-Abnahme entspricht. Des Weiteren wurde im Fermenter 2 die Bildung von Lactat über den gesamten Zeitraum der Biotransformation beobachtet, wohingegen die 3HPA-Bildung bereits nach 60 min stoppte. Interessanterweise konnte ein langsamerer Glucoseabbau in Fermenter 2 bei erneuter Glucosezugabe beobachtet werden, währenddessen der Glucoseabbau von Fermenter 1 bei 100 min dem von Fermenter 2 beim Start der Messung entsprach. Acetat, das aus Glucose gebildet wurde, eluierte in der HPLC-Messung kurz nach 3HPA, wodurch eine genaue Trennung beider Stoffe nicht mehr möglich war. Aus diesem Grund erfolgte die 3HPA-Bestimmung über die Höhe des 3HPA-Peaks.

Es zeigte sich bei der Glucosezugabe am Anfang der Biotransformation erwartungsgemäß eine verbesserte 3HPA-Bildung. Diese war jedoch nur sehr gering und wurde durch die Reduktion zu 1,3-PDO relativiert.

3.3 Carbohydrazid und dessen Reaktion mit 3HPA

Alle bisherigen Versuche, die Enzymaktivität der Zellen durch die Variation der Prozessparameter zu erhalten, veränderten nicht den typischen Verlauf der Reaktion. Nach 45-60 min kam mit 500 mM Glycerin die 3HPA-Produktion vollständig zum Erliegen. Diese Versuche konnten jedoch das Produkt 3HPA (reaktiver Aldehyd) als Ursache dieses Phänomens eingrenzen.

Es gibt bereits Publikationen, die sich mit der Aldehyd-Bindung von Semicarbazid befassen (Ulmer und Zeng, 2007; Slininger et al., 1990; Hahn und Niemer, 1934). Auch bei der 3HPA-Herstellung wurde bereits Semicarbazid zum Schutz von 3HPA vor einer Reduktion zu 1,3-PDO mehrfach bei *K. pneumoniae* erfolgreich eingesetzt (Ulmer und Zeng, 2007; Vancauwenberge et al., 1990; Slininger und Bothast, 1985; Slininger et al., 1983). Eine Anwendung von Semicarbazid bei *L. reuteri* wurde bisher nur von Talarico et al. (1988) versucht, wobei keine Verbesserung der 3HPA-Produktion erkannt werden konnte und die Zugabe von Semicarbazid als hemmend beschrieben wurde.

Das bisher biotechnisch noch nicht verwendete Carbohydrazid wurde mittels einer Teilstruktursuche (R-CO-NH-NH_2) basierend auf Semicarbazid ermittelt (www.sigmaaldrich.com). Aufgrund der geringen Datendichte wurde Carbohydrazid und Semicarbazid näher charakterisiert und dessen 3HPA-Bindungseigenschaften während der Biotransformation zum Schutz der Biomasse untersucht.

3.3.1 pK_B -Bestimmung von Carbohydrazid und Semicarbazid

Aufgrund der fehlenden Daten der Säure- bzw. Basenkonstante für Carbohydrazid und einem pK_B -Wert von 3,66 für Semicarbazid mit Aceton (Conant und Bartlett, 1932) wurden diese in einer Titration bestimmt. Dies diente der näheren Charakterisierung und dem Vergleich mit weiteren möglichen Fängerstoffalternativen.

Es erfolgte bei 35°C eine Titrierung einer 1 M Carbohydrazidlösung sowohl mit 1 M KOH als auch mit 1 M HCl (Abb. 27 A). Darüber hinaus wurde nach einer Ansäuerung einer 1 M Carbohydrazidlösung durch 1 M HCl nur mit 1 M KOH titriert (Abb. 27 B). Die 1 M Semicarbazidlösung wurde aufgrund der enthaltenen Salzsäure und der daraus resultierenden sauren Lösung nur mit 1 M KOH titriert (Abb. 27 C).

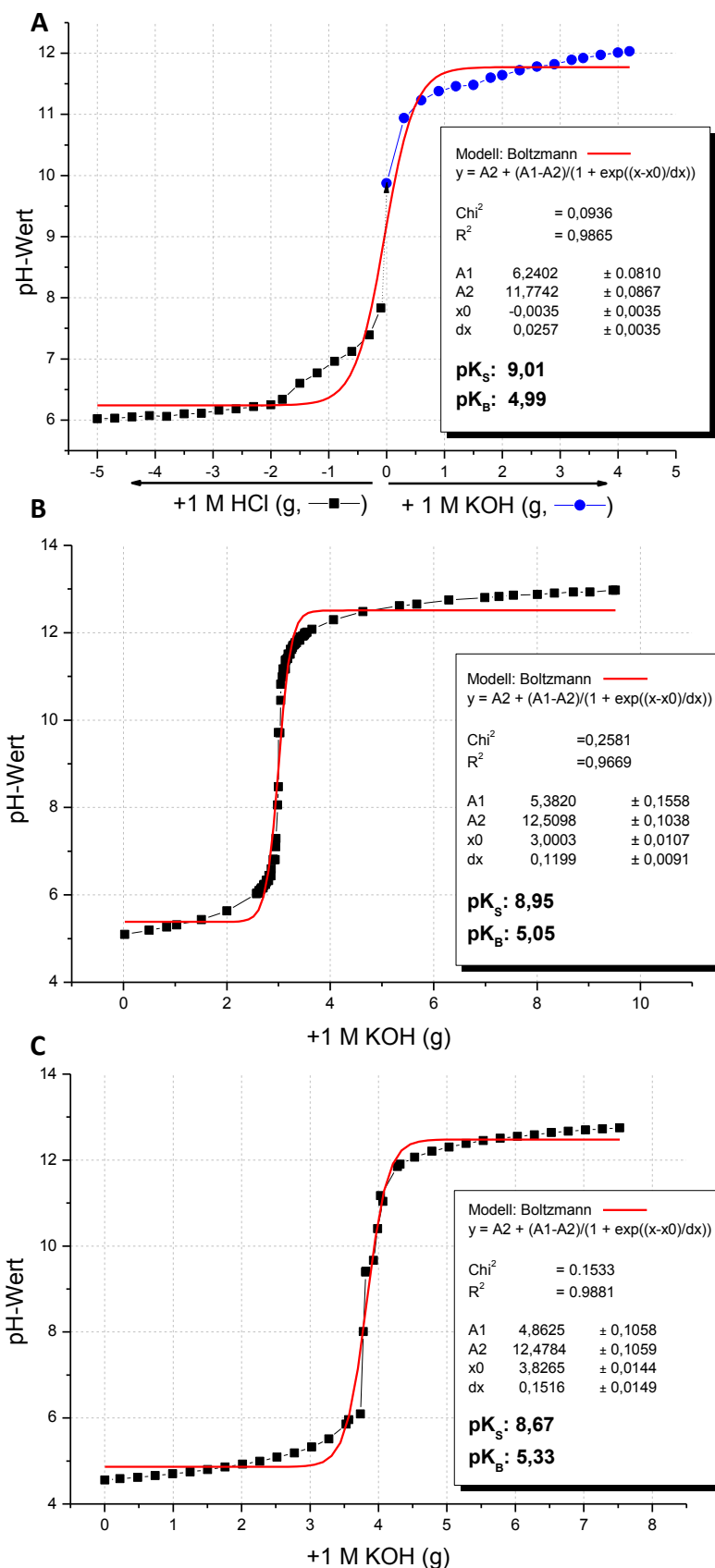


Abb. 27: **pK_B-Wert-Bestimmung durch Titration der Fängerstoffe Carbohydrazid und Semicarbazid in wässriger Lösung bei 35°C;** (A) 1 M Carbohydrazid mit 1 M HCl und 1 M KOH titriert, (B) 1 M Carbohydrazid mit 1 M HCl angesäuert und mit 1 M KOH titriert, (C) 1 M Semicarbazid/HCl mit 1 M KOH titriert

Mittels einer Näherungsgleichung nach Boltzmann konnte durch das Datenanalyse- und Grafikprogramm Origin 8.0 Pro (OriginLab Corporation, Northhampton, USA) für Carbohydrazid ein pK_B -Wert von 5,0 und für Semicarbazid/HCl ein pK_B -Wert von 5,3 bei 35°C in Wasser bestimmt werden.

3.3.2 Präparative chromatographische Aufreinigung von 3HPA

Durch die Verwendung suspendierter Zellen in der Biotransformation enthielt die Biotransformationsbrühe eine Vielzahl komplexer Zellbestandteile (z.B. durch Zellbruch). Da 3HPA kommerziell nicht verfügbar ist, musste es daraus aufgereinigt werden. Im Gegensatz zu dem in Vollenweider et al. (2003) verwendeten aufwendigen Verfahren, ist die präparative chromatographische Aufreinigung per HPLC eine schnell verfügbare und dennoch effiziente Methode zugleich.

Für die chromatographische Aufreinigung wurde eine fängerstofffreie Biotransformationsprobe in die modifizierte HPLC-Anlage (Abschnitt 2.7.1.3) injiziert, manuell fraktioniert und diese Fraktionen erneut vermessen (Abb. 28).

Bei einem Injektionsvolumen von 1000 μ L konnte keine ausreichende Trennung von Glycerin und 3HPA erzielt werden (Abb. 28 A). Aus diesem Grund wurde das Injektionsvolumen auf 500 μ L gesenkt, das zu einer deutlich verbesserten Trennung führte (Abb. 28 B). Letztendlich wurden die Fraktionen 4 bis 7 zusammengefasst, da diese die höchste Konzentration an 3HPA enthielten (Abb. 28 B).

Das so aufgereinigte 3HPA wies kein 1,3-PDO auf und der Anteil an Glycerin sowie 3HP konnte ebenfalls stark reduziert, obgleich nicht vollständig entfernt, werden (Abb. 28 B). Um die weitere säurekatalysierte Reaktion von 3HPA zu Acrolein zu verringern, wurde das enthaltene Laufmittel Schwefelsäure neutralisiert. Mittels dieser Methodik konnte eine aufgereinigte 27 mM 3HPA-Lösung in 5 mM H_2SO_4 hergestellt werden, die nun in der Massenspektrometrie eingesetzt werden konnte, um nähere Aussagen über den Bindungsmechanismus des Fängerstoffs Carbohydrazid mit dem reaktiven Aldehyd 3HPA zu erlangen.

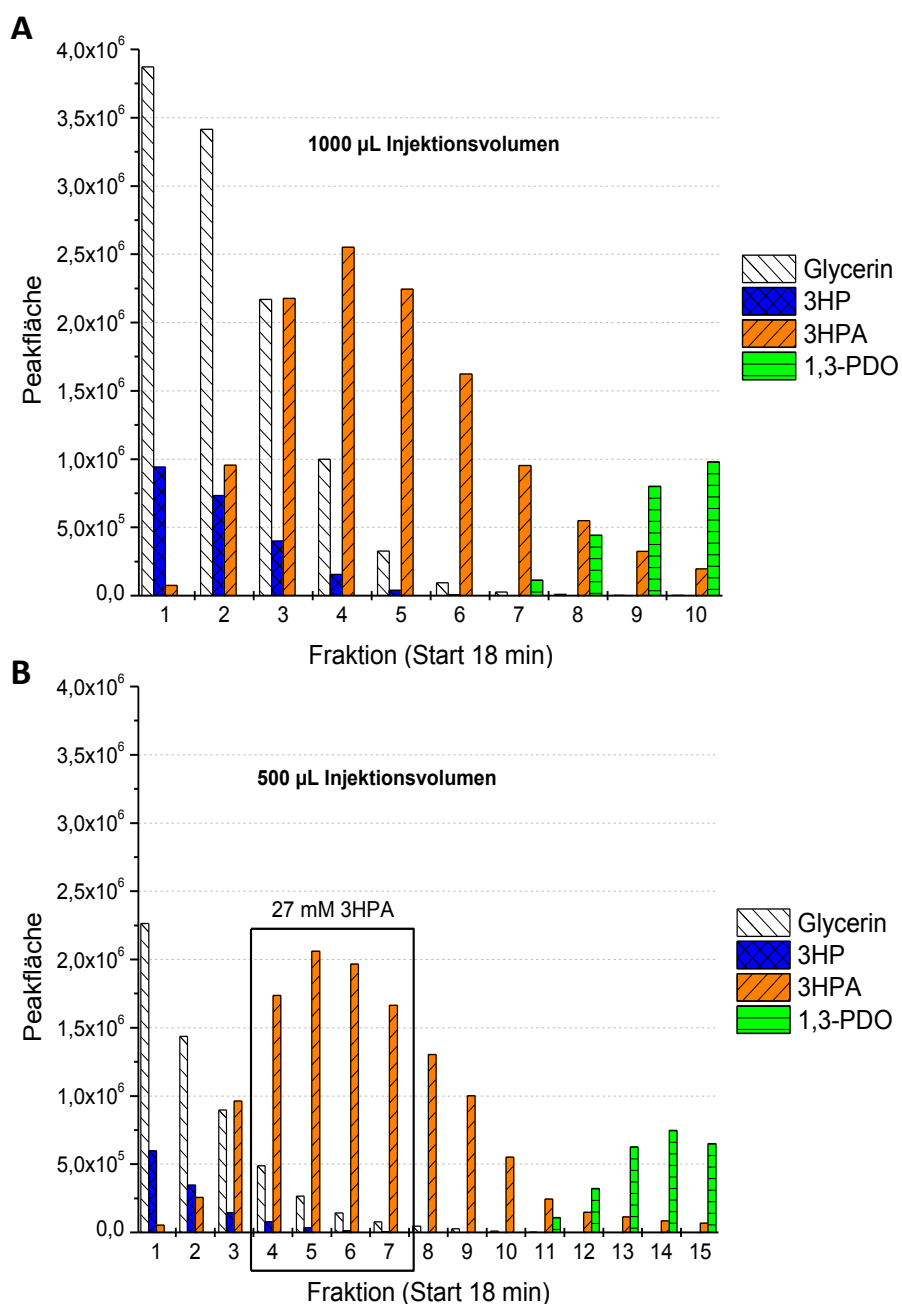


Abb. 28: **Präparative Aufreinigung von 3HPA mittels HPLC**; Fraktionierung von (A) 1000 µL und (B) 500 µL Probenvolumen, Flächenbestimmung für Glycerin, 3HPA und 1,3-PDO im RID- und 3HP im UVD-Chromatogramm (Biotransformationsprobe ohne Fängerstoffzugabe, HPX-87H-Vorsäule (30x4,6 mm), HPX-87H-Hauptsäule (300x7,8 mm), 40°C, 0,5 mL/min 5 mM H₂SO₄, 1000 µL Probenschleife, Fraktionierung in 3 Tropfen \approx 5 sec \approx 100 µL)

3.3.3 Massenspektrometrische Untersuchung der 3HPA-Carbazonbildung

Der Fängerstoff Carbohydrazid ist theoretisch in der Lage, mit seinen zwei Hydrazinogruppen zwei Moleküle 3HPA (Aldehyd) zu binden. Mithilfe der Massenspektrometrie sollte geklärt werden, ob beide 3HPA-Carbazone nachweisbar sind.

Das nach Abschnitt 3.3.2 aufgereinigte 3HPA (2,7 mM) wurde jeweils mit 0,2 g/L (2,2 mM) bzw. 0,1 g/L (1,1 mM) Carbohydrazid vermischt und massenspektrometrisch, wie in Abschnitt 2.7.2 beschrieben, analysiert (Abb. 29).

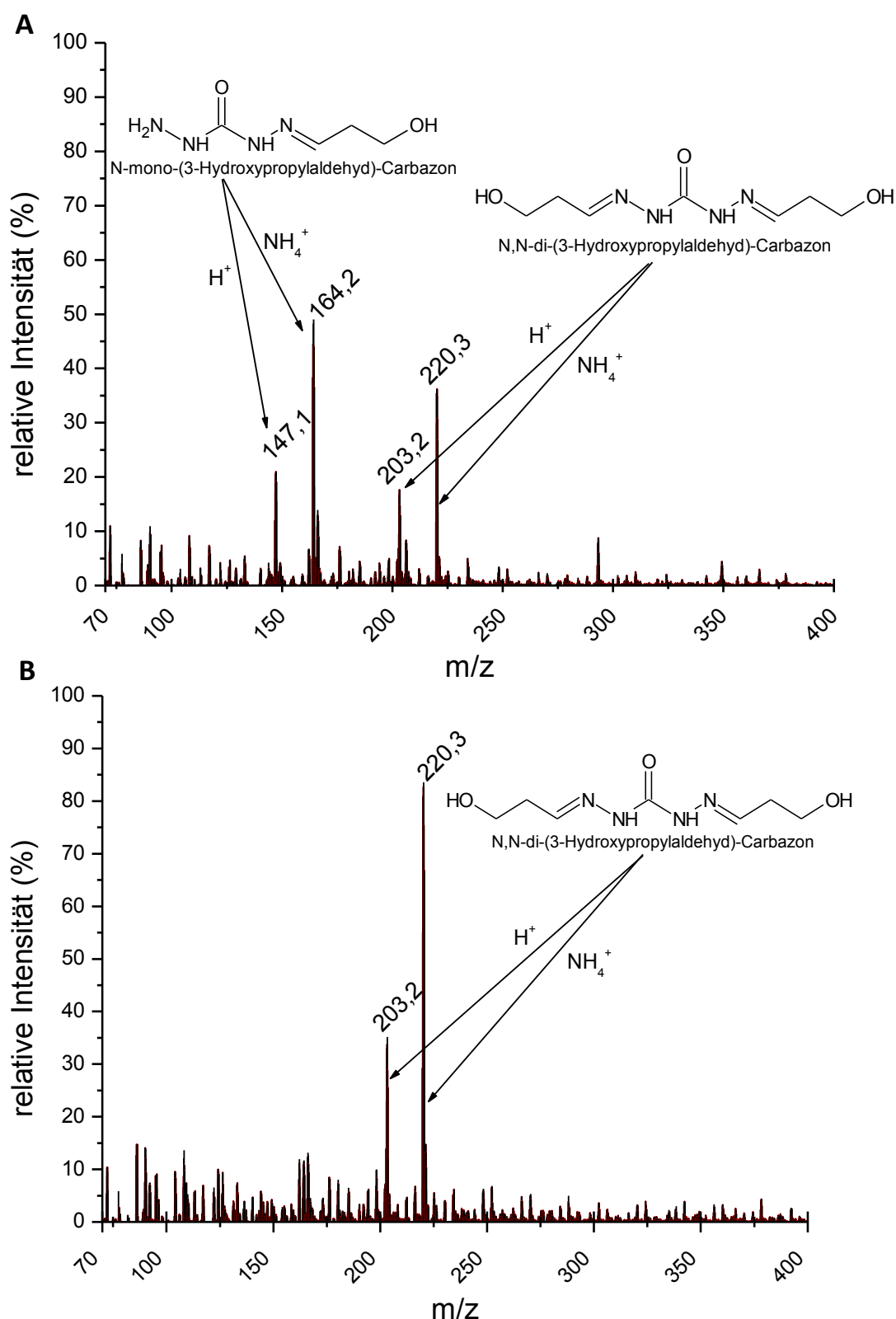


Abb. 29: **Massenspektrometrischer Nachweis der verschiedenen Carbazone**; MS-Spektrum von aufgereinigtem 3HPA und Carbohydrazid (A) in der molaren Mischung 1,2:1 und (B) mit 3HPA im Überschuss

Es konnten sowohl für das N,N-di- und das N-mono-(3-Hydroxypropylaldehyd)-Carbohydrazon die jeweiligen Protonen- bzw. Ammoniumaddukte nachgewiesen werden (Abb. 29 A). Lag der Aldehyd im Überschuss vor, war nur noch N,N-di-(3-Hydroxypropylaldehyd)-Carbohydrazon nachweisbar (Abb. 29 B). Dies bedeutete für die Biotransformation mit Carbohydrazid eine doppelte Bindungskapazität des Fängerstoffs für das entstandene 3HPA.

3.4 Biotransformation mit *L. reuteri* in LentiKats® mit Fängerstoffzugabe

Um die Zellen zur einfachen Abtrennung und Wiederverwertung der Biomasse keinem Zentrifugationsstress aussetzen zu müssen, sowie ihnen einen erhöhten Schutz gegen mechanische Beanspruchung zu geben, wurde *L. reuteri* in LentiKats® nach Abschnitt 2.4.2 immobilisiert. Bei dieser Methode wurden die Zellen in eine Matrix aus Polyvinylalkohol unter physiologisch nahen Bedingungen in einem linsenförmigen und porösen Trägermaterial eingeschlossen, in dem die Bakterien heranwuchsen.

3.4.1 Einfluss der LentiKat®-Komponenten auf die 3HPA-Bildung

Bevor die Immobilisate mit *L. reuteri* in einer Biotransformation eingesetzt werden konnten, musste die Möglichkeit einer Reaktion von 3HPA mit den Bestandteilen der LentiKats®-Matrix (z.B. Polyvinylalkohol, Polyethylenglykol) getestet werden.

Hierzu wurden je 2x500 mL einer gut gewachsenen Bakterienkultur geerntet, vereinigt und mit 0,1 M KPP pH 5 auf eine Zellsuspension von 3×10^{10} Zellen/mL eingestellt. Die Biotransformation erfolgte im 50-mL-Maßstab mit zusätzlichen 5 g/50 mL zellfreien LentiKats® stehend sowie pH-ungeregelt, wobei im Kontrollansatz auf die zellfreien LentiKats® verzichtet wurde (Abb. 30). Die Herstellung der zellfreien LentiKats® erfolgte durch den Ersatz der Zellsuspension mit dem gleichen Anteil an Wasser.

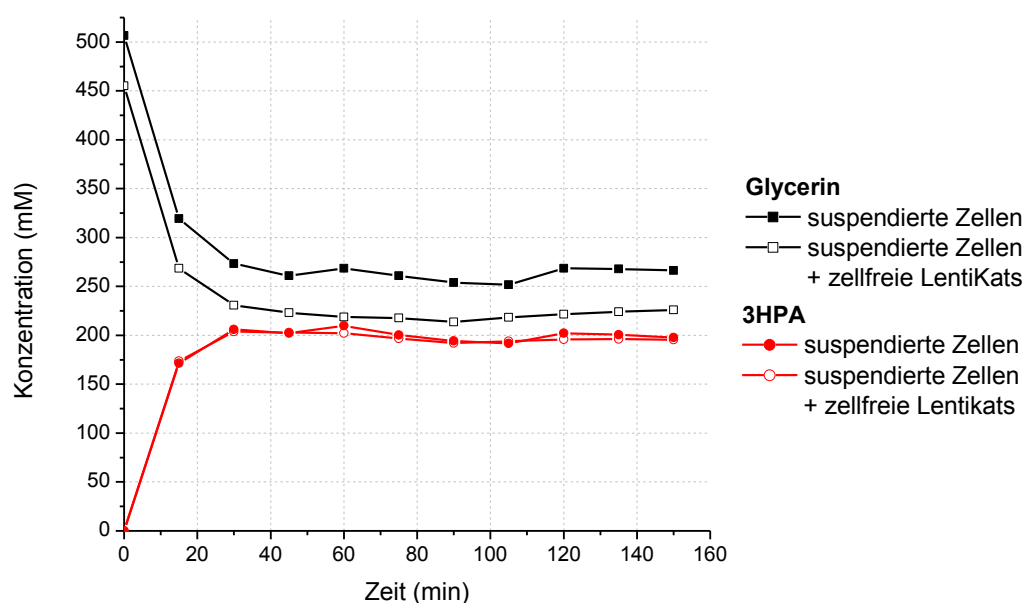


Abb. 30: Einfluss von unbeladenen LentiKats® auf die Biotransformation von *L. reuteri* in Zellsuspension; (10^{10} Zellen/mL, ohne Fängerstoff, 35°C, pH 5 - ungeregelt, 500 rpm, anaerob)

Die Zugabe der unbeladenen Immobilisate zeigte keinen negativen Einfluss auf die Menge an freiem 3HPA während der Biotransformation (Abb. 30). Es zeigte sich jedoch ein Verdünnungseffekt der unbeladenen LentiKats® auf die Glycerinkonzentration. Dementgegen konnte kein Unterschied in der 3HPA-Konzentration gemessen werden, sodass mit der Nutzung der LentiKats® mit *L. reuteri* für die biotechnische 3HPA-Herstellung begonnen wurde.

3.4.2 Einfluss von verschiedenen Fängerstoffen auf die 3HPA-Produktion

Bereits in Abschnitt 3.2 wurde die Toxizität des Produktes 3HPA allein als Ursache für die Biokatalysatorinaktivierung erkannt. Demzufolge wurden die bereits in der Literatur bestehenden Ansätze mit Semicarbazid als Fängerstoff zum Reduktionsschutz aufgegriffen (Abschnitt 1.5). Neben der Anwendung von Semicarbazid wurde der noch nie biotechnisch

verwendete Fängerstoff Carbohydrazid erstmalig zur Bindung von 3HPA bei der Biotransformation von Glycerin mit *L. reuteri* eingesetzt und die biologischen Zusammenhänge der Substrat- und Fängerstoffkonzentration untersucht.

Der Einfluss der Fängerstoffe Carbohydrazid und Semicarbazid auf die 3HPA-Produktion wurde mit LentiKat®-Immobilisaten in Repeated-Batch-Biotransformationen mit 500 mM Glycerin pro Zyklus untersucht (Abschnitt 2.5.2). Dabei enthielt der Reaktionspuffer jeweils 360 mM und 500 mM Semicarbazid bzw. 260 mM und 520 mM Carbohydrazid. In der Kontrolle wurde kein Fängerstoff zugegeben (Abb. 31). Der Pufferaustausch zwischen den einzelnen Zyklen erfolgte aerob ohne Waschschrift.

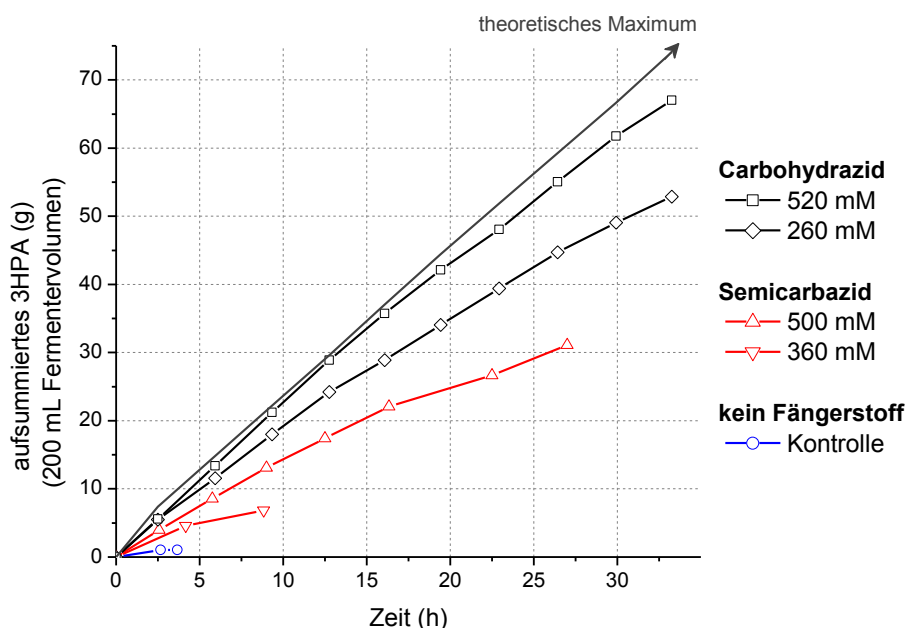


Abb. 31: **Produktion von 3HPA in einer Repeated-Batch-Biotransformation mit *L. reuteri* in LentiKats® und unterschiedlichen Fängerstoffen**; Vergleich der aufsummierten, produzierten Menge 3HPA mit 10 % (w/v) LentiKats® und unterschiedlichen Fängerstoffen bzw. Fängerstoffkonzentrationen (200 mL, 500 mM Glycerin, pH 7, 35°C, 500 rpm, anaerob), Wiederverwendung der Immobilisate in jedem Zyklus

Ohne Fängerstoffzugabe kam die Reaktion nach ca. 60 min zum Erliegen, es wurde kein weiteres 3HPA gebildet und der Biokatalysator war nicht erneut einsetzbar (Abb. 31). Bereits die Verwendung von 360 mM (40 g/L) Semicarbazid führte zu einer Verbesserung der 3HPA-Ausbeute, wobei die Biomasse in einem 2. Zyklus erneut 3HPA produzierte, in einem dritten Zyklus jedoch nur marginale Aktivität zeigte (Abb. 31). Diese eingesetzte Menge Semicarbazid reichte dabei für ein komplettes Entgiften von 3HPA im Vergleich zum eingesetzten Glycerin (500 mM) nicht aus. Erst der Einsatz von 500 mM Semicarbazid (äquivalent zu Glycerin) verbesserte die Reaktion deutlich, da hierbei die Biomasse mindestens 7 Zyklen wiederverwendet werden konnte. Die gebildete 3HPA-Menge (31 g) ist im Vergleich zum theoretischen Maximum (74,08 g) mit 42 % jedoch gering (Abb. 31). Bei der Verwendung von 260 mM Carbohydrazid, das einem äquivalenten Verhältnis zwischen Glycerin und Hydrazinogruppen mit 10 mM Überschuss entspricht, konnte die Biomasse erstmalig für mindestens 10 Zyklen wiederverwendet werden. Dabei wurden 53 g 3HPA bei einem Umsatz von 72 % (Abb. 31) gebildet. Durch die Zugabe von 520 mM Carbohydrazid, das einem doppelt äquivalentem Überschuss an Hydrazinogruppen bzw. der äquimolaren Menge an Fängerstoff im Vergleich zum eingesetzten Glycerin mit 20 mM Überschuss entspricht, wurden bei einer Laufzeit von 33 h 67 g 3HPA gebildet und der Umsatz auf 90 % gesteigert (Abb. 31). Dies

stellt eine Verbesserung der Standzeit um das 33fache und eine 67fache Verbesserung der 3HPA-Produktion in LentiKats® bei pH 7 dar.

In den folgenden Optimierungsschritten wurde Carbohydrazid aufgrund der deutlich besseren 3HPA-Produktion und der geringeren Toxizität gegenüber Menschen im Gegensatz zu Semicarbazid verwendet.

3.4.3 Verschiebung des pH-Optimums durch den Fängerstoffeinsatz

Während der Biotransformation von Glycerin mit *L. reuteri* wurde durch das Nebenprodukt 3HP bei ungeregeltem pH-Wert eine Senkung des pH-Wertes auf 4,5 - 5 beobachtet (Daten nicht gezeigt). Bei der konstanten Regelung des pH-Wertes mit KOH zeigte sich die Dehydratisierung von Glycerin zu 3HPA als pH-Wert-abhängige Reaktion (Daten nicht gezeigt). Bereits die Verwendung von Semicarbazid ließ eine Verschiebung des pH-Optimums vermuten. Dies sollte nun mit der Verwendung von Carbohydrazid untersucht bzw. belegt werden.

Für die Untersuchung des pH-Optimums wurde der pH-Wert konstant auf pH 5 bzw. pH 7 geregelt (5 M KOH). Die Biotransformation erfolgte mit 10 % (w/v) LentiKats®, 500 mM Glycerin und 520 mM Carbohydrazid (Abschnitt 2.5.2), wobei in der Kontrolle kein Fängerstoff zugegeben wurde (Abb. 32).

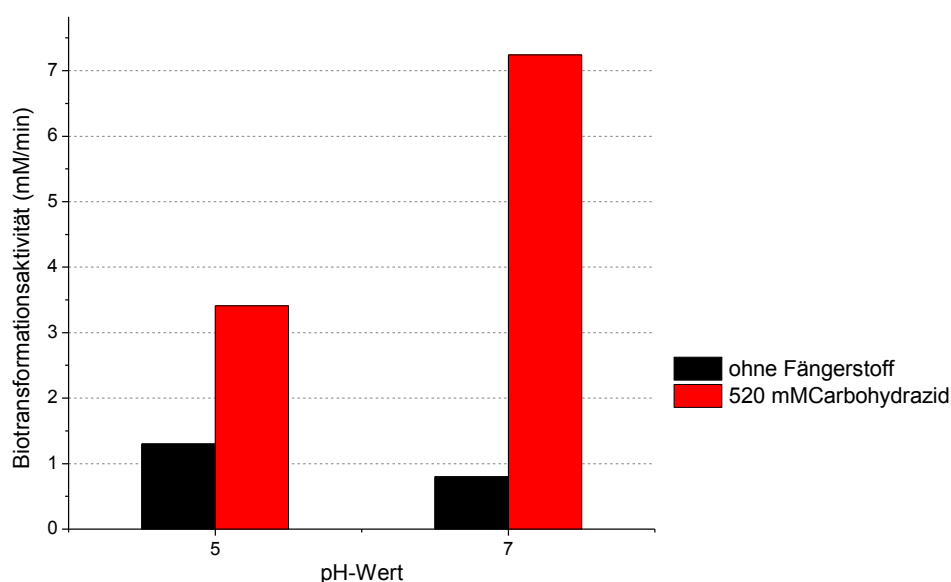


Abb. 32: **pH-Wert-Abhängigkeit der Biotransformation**; Vergleich der Biotransformationsaktivität bei unterschiedlichem pH-Wert mit und ohne Carbohydrazid (10 % LentiKats®, 200 mL, 500 mM Glycerin, 35°C, 500 rpm, anaerob)

Generell ist die Biotransformationsaktivität bei der Verwendung von Carbohydrazid im Gegensatz zu seinem Verzicht um ein Vielfaches höher (Vergleich Abb. 20 B und Abb. 23 B). Ohne den Einsatz von Fängerstoffen konnte die höchste Biotransformationsaktivität bei pH 5 erzielt werden (Abb. 32), während eine Erhöhung auf pH 8 bzw. eine Erniedrigung auf pH 4 in einer stark verminderten 3HPA-Produktion resultierte (Daten Creavis/Evonik). Durch die Benutzung von Carbohydrazid als 3HPA-Fängerstoff erfolgte eine Verschiebung des pH-Optimums ins Alkalische, sodass bei pH 7 eine höhere Biotransformationsaktivität gemessen wurde (Abb. 32).

Basierend auf diesen Ergebnissen wurden abweichend zu den Biotransformationen ohne Fängerstoffverwendung (pH 5) die Biotransformationen mit Fängerstoffeinsatz bei pH 7 durchgeführt. Das genaue pH-Optimum wurde später in Zellsuspensionsversuchen mit Carbohydrazid ermittelt (Abschnitt 3.5.4).

3.5 Optimierung der Biotransformation mit Carbohydrazid

Nach der Verbesserung der Biomasseanzucht und sowohl der 67fachen 3HPA-Produktionssteigerung bei pH 7 als auch der 33fachen Standzeitverlängerung in LentiKats[®] durch die Carbohydrazidzugabe wurde die Biotransformation mit *L. reuteri* optimiert. Aufgrund des hohen zeitlichen Aufwandes zur Herstellung von LentiKats[®] erfolgten die Optimierungsversuche mit suspendierten Zellen, die in einer 10-L-Fermentation hergestellt und aliquotiert bei -80°C gelagert wurden.

3.5.1 Lagerungsstabilität aktiver Biomasse bei -80°C

Aufgrund des Zusatzes von 20 % (v/v) DMSO für die -80°C-Lagerung wurde zunächst das Biotransformationsverhalten der Biomasse unter Anwesenheit dieses organischen Lösungsmittels untersucht.

Die Biomasseanzucht erfolgte anaerob im Batch-Verfahren in einer 1-L-Schraubdeckelflasche (Schott AG, Mainz, Dtl.), wobei die Fermentationsbrühe vor der Zentrifugation (4000 x g, 10 min, 4°C) auf zwei Zentrifugationsvials verteilt wurde. Ein Pellet wurde in 0,1 M KPP pH 5 + 20 % DMSO (v/v) resuspendiert und sofort bei -80°C in Kunststoffvials (14 mL) eingefroren. Das zweite Pellet wurde mit 0,1 M KPP pH 5 auf eine Zellsuspension von 10^{10} Zellen/mL eingestellt und anschließend in einer Biotransformation ohne Fängerstoffzugabe mit 180 mM Glycerin eingesetzt. Nach 2 Wochen wurde das -80°C Aliquot wieder aufgetaut, abzentrifugiert (4000 x g, 4°C, 10 min), mit 0,1 M KPP pH 5 das erhaltene Pellet ebenfalls auf eine Zellsuspension von 10^{10} Zellen/mL eingestellt und in einer Biotransformation mit 180 mM Glycerin eingesetzt (Abb. 33).

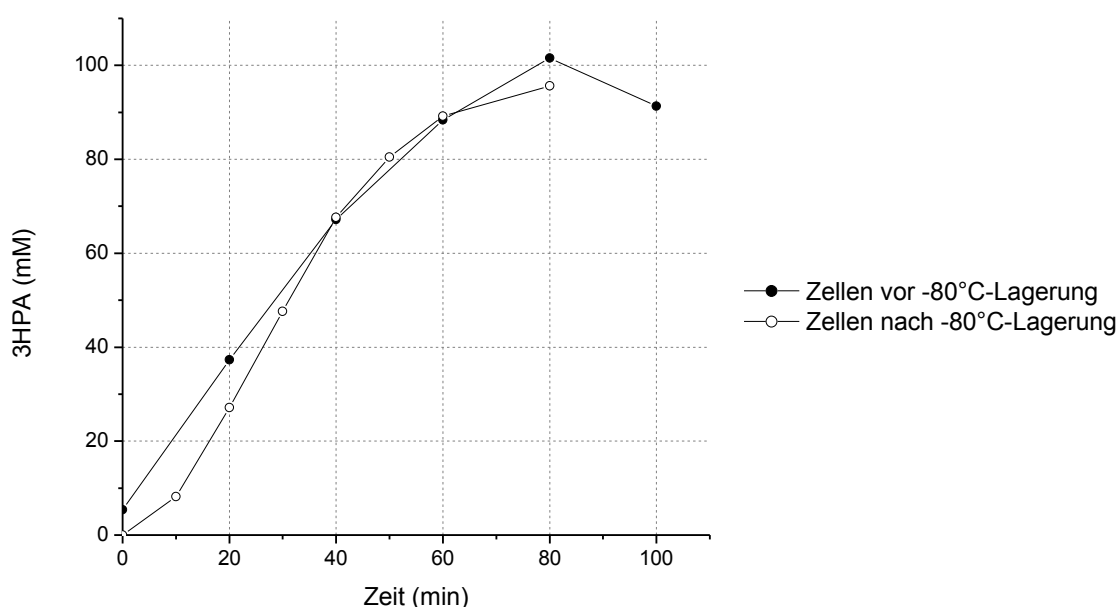


Abb. 33: **Auswirkung der Lagerung von *L. reuteri* bei -80°C auf die 3HPA-Bildung;** Vergleich der Biotransformationen vor und nach der Lagerung mit 20 % (v/v) DMSO bei -80°C (10^{10} Zellen/mL, 35°C, pH 7, 500 rpm, anaerob)

Bezüglich der 3HPA-Bildung zeigte sich ein ähnlicher Reaktionsverlauf mit einer leichten Lag-Phase (Abb. 33). Somit konnte diese Methodik für die Lagerung GDHt-aktiver Biomasse verwendet werden. Trotz eines Waschschrilles bei der Zentrifugation wurde bei der Verwendung dieser Biomasse in der Biotransformation immer eine deutliche Verschleppung von 10-20 mM DMSO in die Biotransformationsbrühe gemessen.

3.5.2 Herstellung der Biomasse für Optimierungsversuche im 10-L-Maßstab

Für die notwendige Vielzahl an Einzelexperimenten wurde eine größere Menge an Biomasse nötig. In einer 10-L-Fed-Batch-Fermentation sollte dies unter den optimierten Bedingungen (Abschnitt 3.1.4 und 3.1.5) durchgeführt werden, um die Biomasse mit größtmöglicher GDHt-Aktivität zu ernten und die suspendierten Zellen aliquotiert bei -80°C zu lagern. Dadurch wurden vor allem Schwankungen in der Biomasseanzucht verhindert und der zeitliche sowie materielle Aufwand minimiert.

Hierfür wurde eine anaerobe 10-L-Fed-Batch-Fermentation im BiostatE® (Abschnitt 2.2.5) mit gekoppelten Glucose- und optimierten Suppline-Feed durchgeführt (Abb. 34).

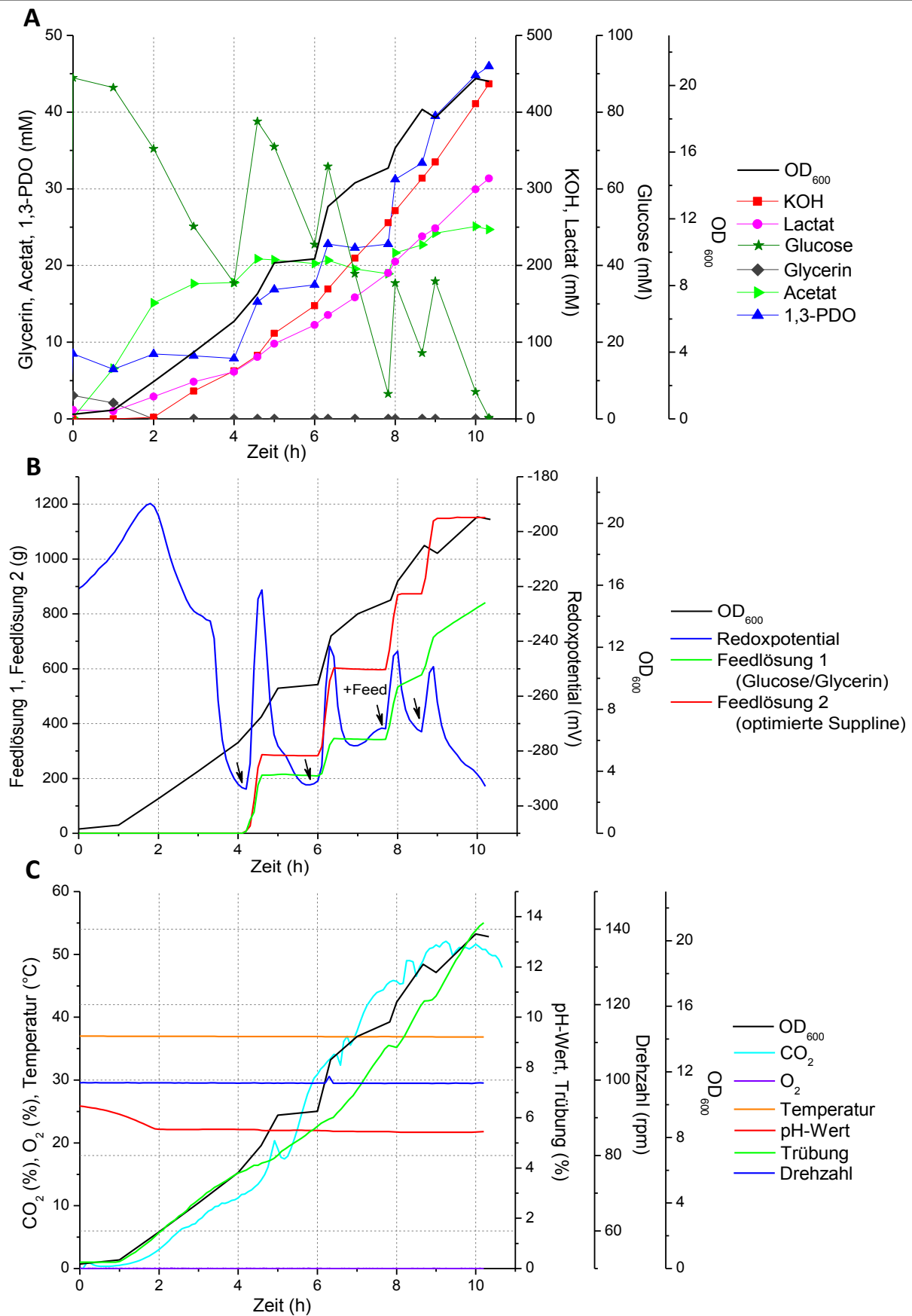


Abb. 34: Herstellung aktiver *L. reuteri* Biomasse im Biostat[®] mittels 10-L-Fed-Batch-Fermentation; (A) Konzentrationsverläufe, (B) Feedzugabe und Redoxpotential, (C) Fermentationsbedingungen, Biomasseernte nach 10,2 h, (37°C, pH 5,5, 100 rpm, anaerob)

Nach 10,2 h konnte bei einer Zelldichte von 7×10^9 Zellen/mL ($OD_{600} = 20,3$) die Biomasse geerntet (Abb. 34), 120 Vials à 14 mL GDHt-aktive Zellsuspension hergestellt und bei -80°C gelagert werden. Im Gegensatz zu einer typischen -80°C -Lagerung mit Glycerin musste dieses durch DMSO ersetzt werden, da anderenfalls beim Einfrieren oder Auftauen der Biomasse bereits 3HPA entstehen und die GDHt inaktivieren würde. Jede einzelne Suspension war ausreichend konzentriert, um im 50 mL Maßstab eine Biotransformation mit suspendierten Zellen (10^{10} Zellen/mL) durchzuführen. Die spezifische Aktivität der -80°C -Zellen betrug in einer Testbiotransformation (520 mM Carbohydrazid, 500 mM Glycerin, 10^{10} Zellen/mL, pH 7, 35°C , anaerob) $16,1 \mu\text{kat/g BTM}$. Auf Grundlage dieses Zellmaterials wurden die weiteren Optimierungsexperimente durchgeführt.

3.5.3 Optimierung der eingesetzten Glycerin- und Carbohydrazidkonzentration

Die bisher verwendete Glycerinkonzentration von 500 mM wurde zu Beginn der Arbeiten willkürlich festgelegt. Durch die Aufhebung der toxischen Wirkung des Produktes 3HPA wurde das Substrat zum limitierenden Faktor und der Einfluss der Glycerinkonzentration auf die Biotransformation untersucht. Da diese jedoch in direktem Zusammenhang zur benötigten Carbohydrazidkonzentration steht, bedurfte es einer gekoppelten Optimierung.

In diesen Optimierungsversuchen wurde die in Abschnitt 3.5.2 hergestellte Biomasse im 50 mL Maßstab unter Standardbedingungen (Abschnitt 2.5.2) eingesetzt. Zunächst wurde die Löslichkeitsgrenze von Carbohydrazid in Wasser bei 22°C empirisch auf 2,8 M bestimmt. Bei einer Biotransformationstemperatur von 35°C sollte somit keine Auskristallisation stattfinden. In einer ersten Versuchsreihe wurde bei konstanter Glycerinkonzentration (500 mM) die Carbohydrazidmenge schrittweise auf 2,8 M erhöht (Abb. 35 A). Nachfolgend wurde die maximale Konzentration von 2,8 M Carbohydrazid konstant gehalten und die Glycerinkonzentration variiert (Abb. 35 B).

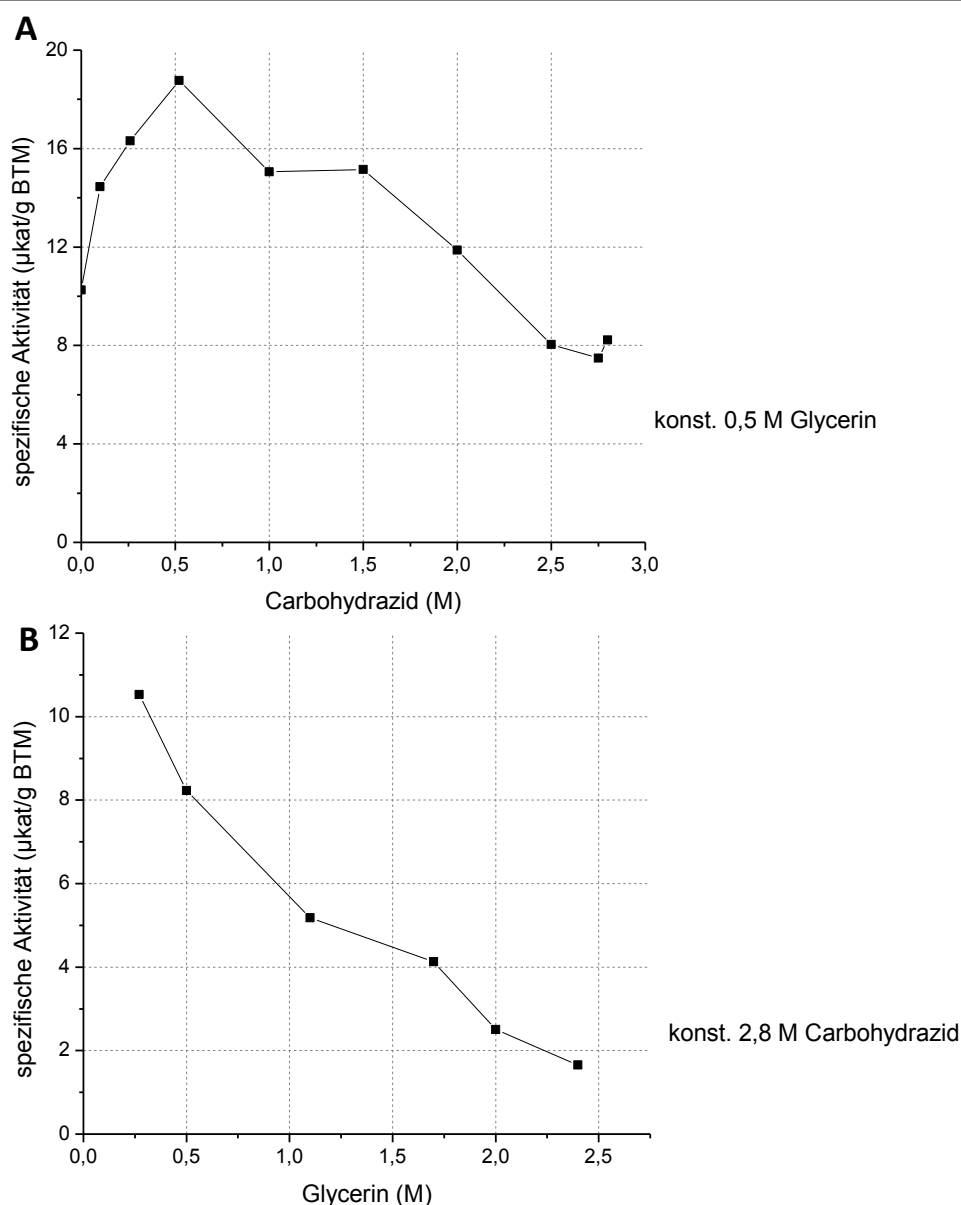


Abb. 35: **Einzeloptimierung der Biotransformation bezüglich der Glycerin- und Carbohydrazidkonzentration mit *L. reuteri* in Zellsuspension;** Einfluss von (A) Carbohydrazid und (B) Glycerin auf die spezifische Aktivität unter jeweils konstanten Bedingungen (10^{10} Zellen/mL, 35°C , pH 7, 500 rpm, anaerob)

Es zeigte sich, dass Carbohydrazid bei steigender Konzentration eine deutlich hemmende Wirkung auf die spezifische Aktivität hat (Abb. 35 A). Ein Aktivitätsmaximum erfolgte bei einem fast äquimolaren Konzentrationsverhältnis von 520 mM Carbohydrazid und 500 mM Glycerin. Auch bei steigender Glycerinkonzentration konnte eine stark hemmende Wirkung beobachtet werden (Abb. 35 B).

Aufgrund dieser grundlegenden Zusammenhänge wurden weitere Glycerin- und Carbohydrazidkonzentrationen unter identischen Bedingungen untersucht. Hierbei wurden beide Konzentrationen jeweils mit der spezifischen Aktivität (Abb. 36 A), der erreichten 3HPA-Endkonzentration (Abb. 36 B) und der Produktivität (Abb. 36 C) durch Interpolation bzw. Gridding nach Renca und Cline durch das Datenanalyse- und Grafikprogramm Origin 8.0 Pro (OriginLab Corporation, Northampton, USA) auf eine Netzstruktur übertragen. Durch diese Darstellung könnten direkt die optimalen Verhältnisse ermittelt werden.

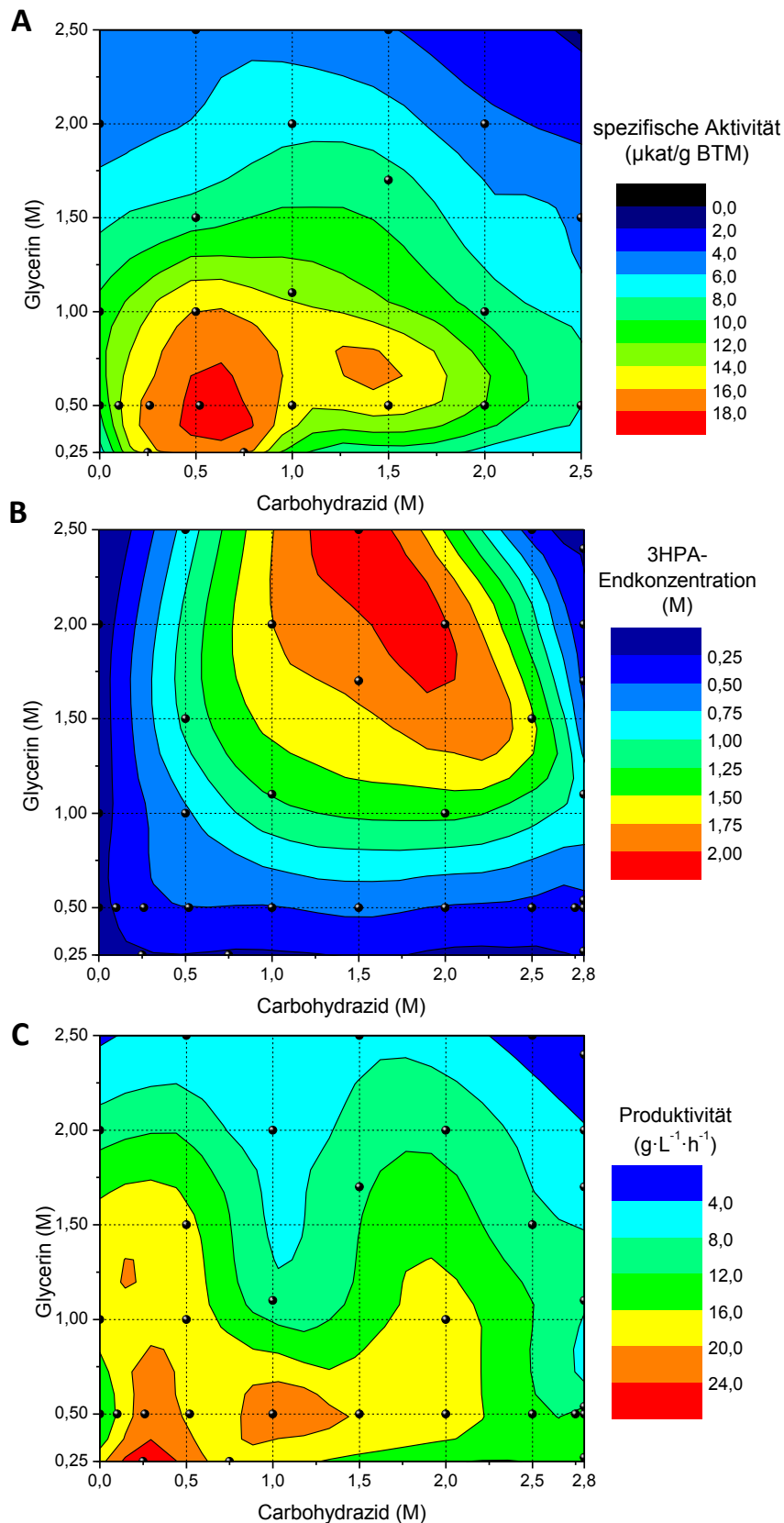


Abb. 36: **Optimierung der Biotransformation bezüglich der Glycerin- und Carbohydrazidkonzentration mit *L. reuteri* in Zellsuspension;** Abhängigkeit der (A) spezifische Aktivität, der (B) 3HPA-Endkonzentration und der (C) Produktivität von der Glycerin- und Carbohydrazidkonzentration (10^{10} Zellen/mL, 35°C , pH 7, 500 rpm, anaerob), ● = Messpunkt

Ausgehend von diesen Ergebnissen konnten optimale, wenn auch verschiedene, Konzentrationsverhältnisse für die maximale Endkonzentration, die spezifische Aktivität und die Produktivität ermittelt werden, deren Biotransformationsverläufe in Abb. 37 zusammenfassend dargestellt sind.

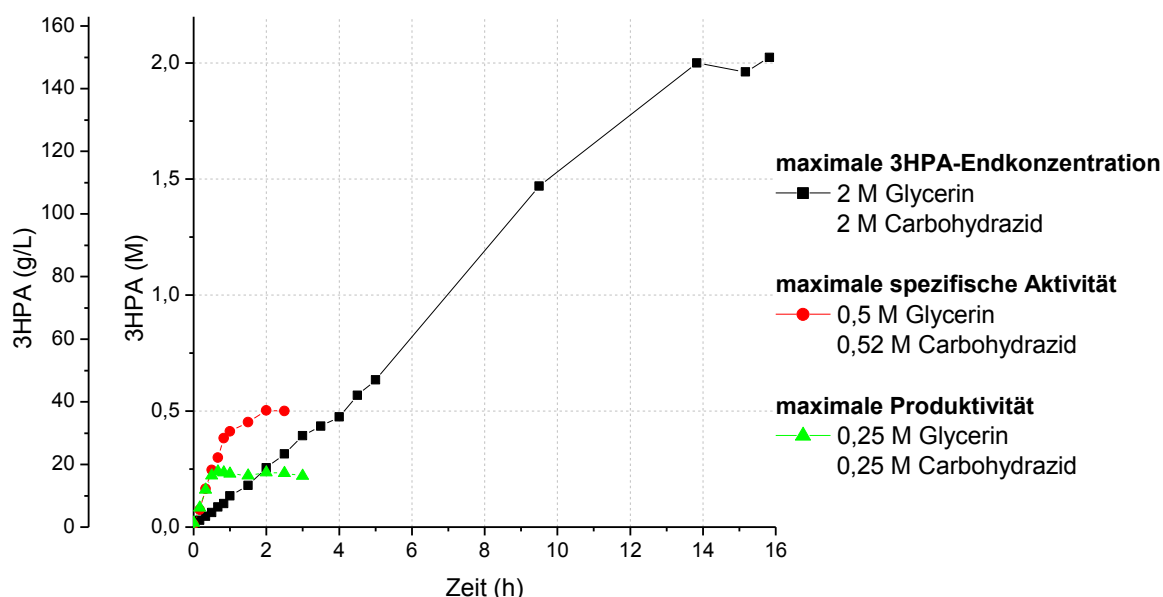


Abb. 37: Vergleich der Batch-Biotransformation mit der höchsten 3HPA-Endkonzentration, spezifische Aktivität und Produktivität; gleiche Skalierung der Ordinatenachsen (10^{10} Zellen/mL, pH 7, 35°C, anaerob)

Für die folgenden Optimierungsschritte der Temperatur und des pH-Wertes wurden die Standardkonzentrationen von 0,5 M Glycerin und 0,52 M Carbohydrazid beibehalten. Bei diesem Verhältnis war die spezifische Aktivität maximal und dennoch bei kurzer Versuchsdauer eine zuverlässige Probenahme gewährleistet.

3.5.4 Optimierung von pH-Wert und Temperatur

Während bisherige Daten von Biotransformationen ohne Fängerstoffzugabe auf ein Optimum von pH 5 hinwiesen, zeigten Biotransformationen mit Fängerstoffzugabe jedoch ein Optimum von pH 7 (Abschnitt 3.4.3). Aufgrund dieser Verschiebung wurde zur genaueren Bestimmung des pH-Optimums der Biotransformation mit Carbohydrazid der Bereich von pH 4 bis pH 9 untersucht. Um eine Kühlung in einem späteren biotechnischen Prozess zu vermeiden, wurde anfänglich eine Temperatur von 35°C in der Biotransformation willkürlich festgelegt. Zur besseren Charakterisierung dieser erfolgte die Temperaturoptimierung zwischen 20°C und 60°C.

In diesen Optimierungsversuchen wurde die in Abschnitt 3.5.2 hergestellte Biomasse im 50 mL Maßstab eingesetzt. Die Biotransformationen zur Temperaturoptimierung wurden nach dem Erreichen der Zieltemperatur gestartet. Für die Optimierung des pH-Wertes wurden Puffer mit dem entsprechenden pH-Wert hergestellt und zur Einstellung der Biomasse auf 10^{10} Zellen/mL verwendet. Der Start der Biotransformation erfolgte bei konstantem pH-Wert bzw. Temperatur mit 500 mM Glycerin. In einer ersten Versuchsreihe wurde bei konstantem pH-Wert (pH 7) der Temperatureinfluss (Abb. 38 A) und in einer zweiten Versuchsreihe bei konstanter Temperatur (35°C) der pH-Wert-Einfluss (Abb. 38 B) untersucht.

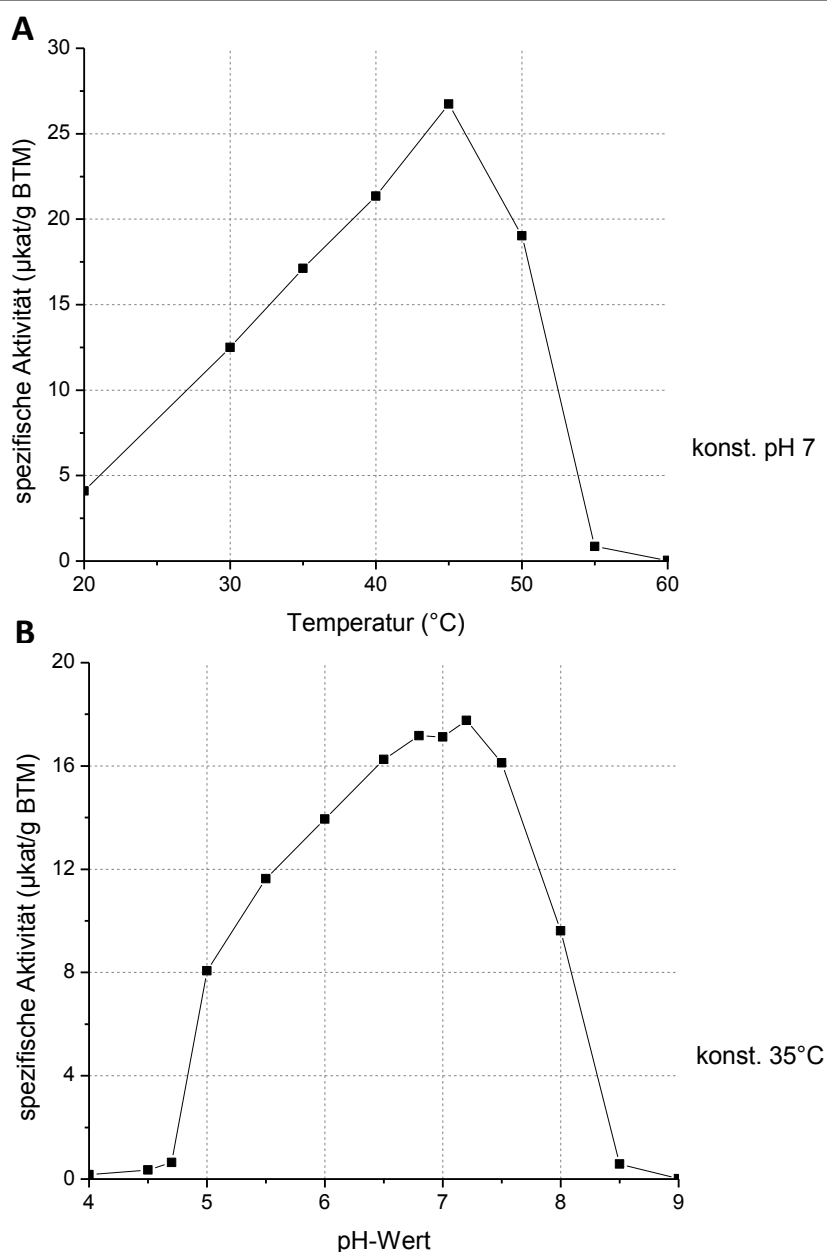


Abb. 38: **Einzeloptimierung der Biotransformation bezüglich von Temperatur und pH-Wert mit *L. reuteri* in Zellsuspension**; Einfluss der (A) Temperatur und des (B) pH-Wertes auf die spezifische Aktivität unter jeweils konstanten Bedingungen (10^{10} Zellen/mL, 500 mM Glycerin, 520 mM Carbohydrazid, 500 rpm, anaerob)

Im Verlauf der einzelnen Betrachtung der Parameter konnte ein Temperaturoptimum von 45°C bei einem konstantem pH 7 und ein pH-Optimum von $\text{pH} = 7,2$ bei konstanten 35°C ermittelt werden (Abb. 38). Um das Optimum der spezifischen Aktivität in Abhängigkeit von der Temperatur und des pH-Wertes zu finden, wurden diese Bedingungen nachfolgend gekoppelt untersucht und durch die Interpolation bzw. Gridding nach Renca und Cline (Origin 8.0 Pro, OriginLab Corporation, Northampton, USA) auf eine Netzstruktur übertragen (Abb. 39).

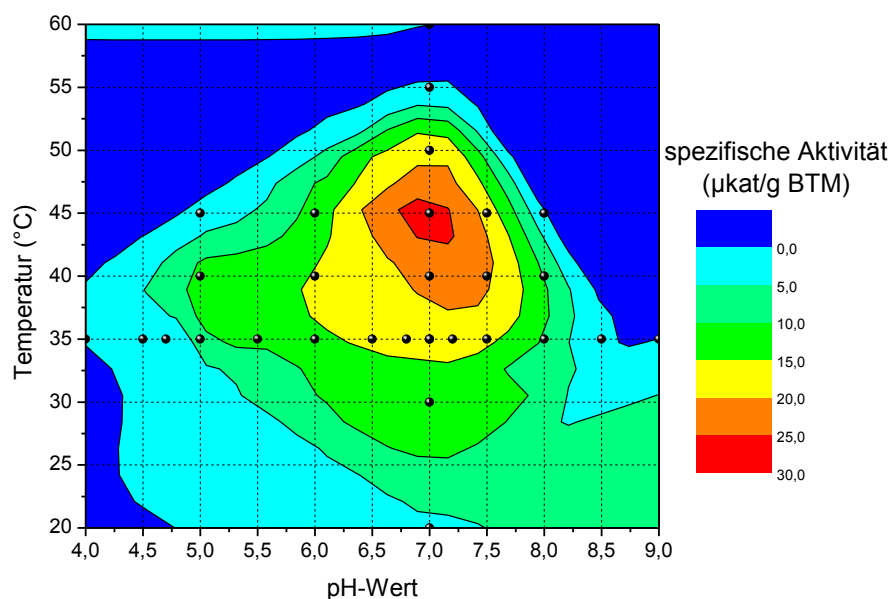


Abb. 39: **Optimierung der Biotransformation bezüglich Temperatur und pH-Wert mit *L. reuteri* in Zellsuspension;** (10^{10} Zellen/mL, 500 mM Glycerin, 520 mM Carbohydrazid, 500 rpm, anaerob),
● = Messpunkt

Die Betrachtung beider Parameter zeigte eine maximale spezifische Aktivität bei 45°C und pH 7 (Abb. 39). Aufgrund der kurzen Reaktionszeit von 150 min konnte jedoch keine Rückschlüsse auf die Temperaturstabilität des Enzyms gezogen werden.

3.5.5 Temperaturstabilitätstest in einer Fed-Batch-Biotransformation

Die Ermittlung des Temperaturoptimums in Abschnitt 3.5.4 erfolgte durch die Bestimmung der spezifischen Aktivität in den ersten 30 min der 150 min Gesamt-Reaktionszeit (Abschnitt 2.6). Daraus konnten jedoch keine Rückschlüsse auf die Stabilität der GDHt gezogen werden. Aus diesem Grund wurde jeweils bei 40°C und 45°C eine Fed-Batch-Biotransformation für mehrere Stunden durchgeführt.

Für diesen Versuch wurde die Biomasse aus dem -80°C-Stock (Abschnitt 3.5.1) verwendet und mit dem Biotransformationspuffer (0,1 M KPP, pH 7, 2 M Carbohydrazid) eine Zellkonzentration von 10^{10} Zellen/mL eingestellt. Somit konnten maximal 4 M 3HPA gebunden werden. Die Glycerinzugabe (500 mM Endkonzentration) erfolgte bei dem Start der Reaktion, nach 1,5 h und 3 h (Abb. 40).

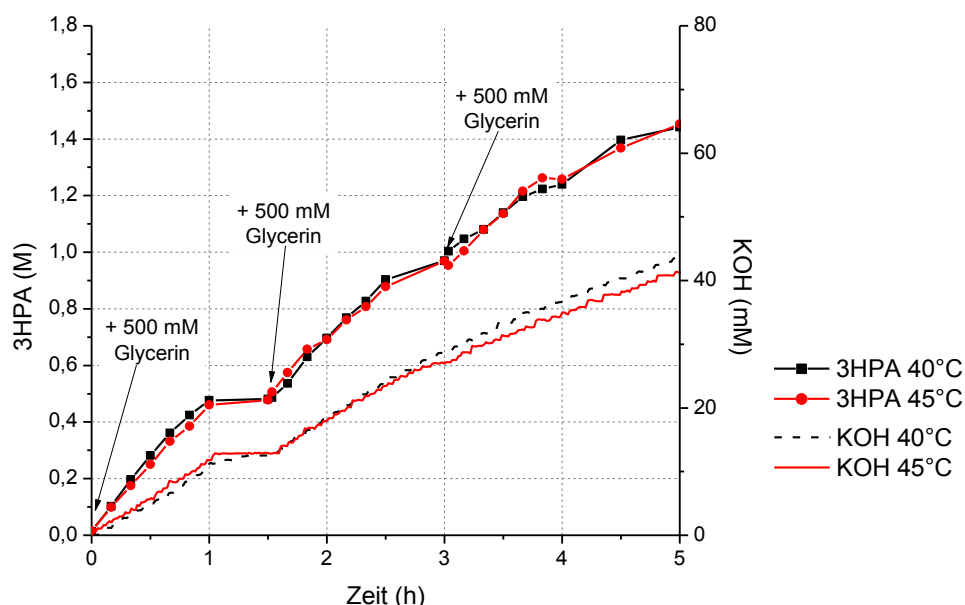


Abb. 40: **Temperaturstabilität der GDHt von *L. reuteri* in der Biotransformation**; Fed-Batch-Verfahren (10^{10} Zellen/mL, 2 M Carbohydrazid, pH 7, 500 rpm, anaerob)

Es zeigte sich über 5 h eine konstante 3HPA-Produktion, wobei kein signifikanter Unterschied zwischen dem Verlauf bei 40°C und 45°C beobachtet werden konnte. Allerdings ist der Laugeverbrauch bei 45°C im Vergleich zu 40°C etwas geringer (Abb. 40).

3.6 Sauerstoffeinfluss auf die 3HPA-Bildung

3.6.1 Sauerstoffexposition der Immobilisate während der LentiKat®-Herstellung

Während der Herstellung der LentiKats® wurden die mit *L. reuteri* beladenen Immobilisate im Rückquellungs- und Stabilisierungsschritt, der dem Auswaschen restlicher Komponenten und der Verbesserung der mechanischen Stabilität der Immobilisate diente, Luftsauerstoff ausgesetzt. Da dieser nach Literaturangaben (Poznanskaya et al., 1977; Johnson et al., 1975; Stroinski et al., 1974) die GDHt-Aktivität inhibiert, wurden verschiedene Stabilisierungszeiten bzw. -bedingungen und Regenerationsschritte untersucht.

Bei der Herstellung der Immobilisate (Abschnitt 2.4.2) zeigte sich nach dem aeroben 2-h-Stabilisierungsschritt in der anschließenden Biotransformation eine marginale 3HPA-Produktion (Abb. 41). Deshalb wurde eine Verkürzung der aeroben Stabilisierungszeit auf 1 h und eine zur anaeroben Stabilisierung (1 h) zusätzliche mikroaerobe Regenerierung in MRS-Medium untersucht (Abb. 41).

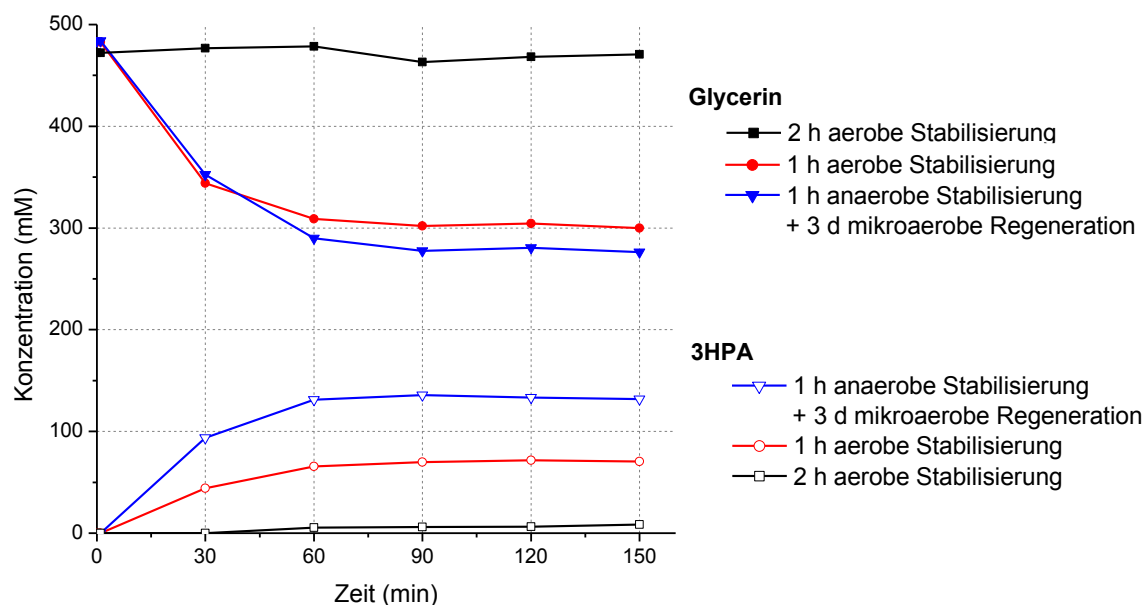


Abb. 41: **Optimierung der LentiKats®-Herstellung**; Einfluss der Stabilisierungszeit bzw. einer anschließenden mikroaeroben Regenerierung der Biomasse auf die Biotransformation (10 % (w/v) LentiKats®, 500 mM Glycerin, 35°C, pH 6 – ungeregt, 500 rpm, anaerob)

Bei der vom Hersteller empfohlenen Stabilisierungszeit von 2 h zeigte sich eine sehr geringe 3HPA-Bildung, die durch eine Reduktion der aeroben Stabilisierungszeit auf 1 h deutlich verbessert werden konnte (Abb. 41). Mit der Kombination aus 1 h Stabilisierungszeit unter anaeroben Bedingungen und der anschließenden Regeneration der Bakterien in MRS-Medium mit Glucose und Glycerin wurde das beste Ergebnis erzielt (Abb. 41). Analog zu Abb. 30 wurde erneut ein deutlicher Mehrverbrauch an Glycerin gemessen. Durch den hohen Wassergehalt der porösen LentiKats® kann dies ein Verdünnungseffekt sein.

Aufgrund dieser Ergebnisse wurden die Immobilisate in einer Anaerobierkammer (Bactron IV, Sheldon, USA) anaerob stabilisiert und anschließend in MRS-Medium regeneriert. Angesichts des Wachstums von *L. reuteri* in Batch-Fermentationen wurde die hier untersuchte 3-Tage-Regeneration auf 16 h reduziert. Dies zeigte eine vergleichbare 3HPA-Bildung in der Biotransformation (Daten nicht gezeigt).

3.6.2 Sauerstoffeinfluss während der Biotransformation mit LentiKats®

Infolge der Aufhebung der toxischen Wirkung des Produktes 3HPA durch die Verwendung von Carbohydrazid konnten weitere Einflüsse auf die Biotransformation untersucht werden. Als einer der wichtigsten Einflussfaktoren gilt Sauerstoff. Bereits Chung et al. (1989) konnten eine komplette Inhibierung der Reuterinproduktion unter Anwesenheit von Sauerstoff zeigen. Des Weiteren wurde in Abschnitt 3.6.1 mit LentiKats® ein negativer Einfluss einer längeren aeroben Stabilisierungszeit auf die gebildete 3HPA-Menge beobachtet.

Um den Einfluss von Sauerstoff genauer zu untersuchen, wurden zwei Versuchsansätze gewählt. In einem ersten Versuch wurde eine mit der Literatur vergleichbare Biotransformation ohne Fängerstoff durchgeführt (10 % (w/v) LentiKats®, 35°C, pH 7, 500 mM Glycerin) durchgeführt. Während die Referenz mit Stickstoff (< 10 ppm O₂) begast wurde, diente im Testansatz Druckluft (21 % O₂) zur Durchlüftung (Abb. 42 A). In einem zweiten Versuchsansatz mit identischem Versuchsaufbau wurde zusätzlich sowohl dem Referenz- als auch dem Testansatz 520 mM Carbohydrazid zugegeben (Abb. 42 B).

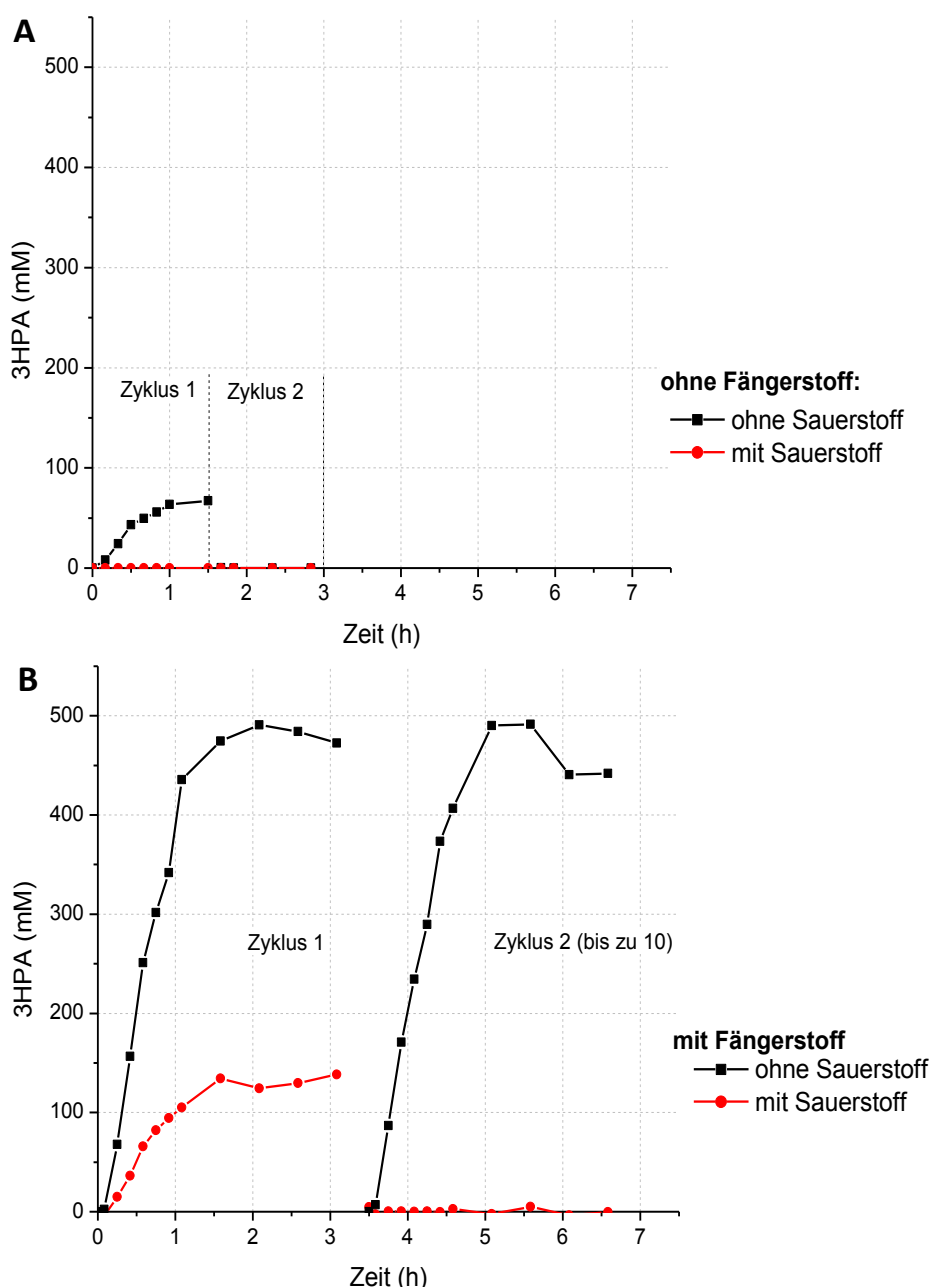


Abb. 42: **Sauerstoffeinfluss auf die 3HPA-Bildung von *L. reuteri* beladenen LentiKats®**; Biotransformation (A) ohne und (B) mit 520 mM Carbohydrazid, Wiederverwendung der Immobilisate (10 % (w/v) LentiKats®, 500 mM Glycerin, 35°C, pH 7, 500 rpm, anaerob)

In der Biotransformation ohne Fängerstoff zeigte sich im Testansatz mit Sauerstoff keine 3HPA-Produktion, während die stickstoffbegaste Kontrolle den typischen gehemmten Reaktionsverlauf aufgrund der toxischen 3HPA-Akkumulation aufwies (Abb. 42 A). Bei der Verwendung von 520 mM Carbohydrazid konnte im Kontrollansatz (Stickstoffbegasung) mit derselben Biomasse mindestens 10 Zyklen lang 3HPA produziert werden. Durch die Anwesenheit von Sauerstoff konnte hingegen im ersten Zyklus überraschenderweise noch eine geringe Menge 3HPA (134 mM) gebildet werden, während ab dem zweiten Zyklus kein 3HPA mehr produziert wurde (Abb. 42 B).

Diese Versuche zeigten deutlich die Empfindlichkeit der Biomasse gegenüber Sauerstoff. Aus diesem Grund wurde die bisherige Stickstoffbegasung für anaerobe Bedingungen beibehalten.

3.6.3 Sauerstoffentfernung durch Carbohydrazid und Semicarbazid

Sowohl der Fängerstoff Carbohydrazid (Slovinsky, 1981) als auch Semicarbazid (Cuisia, 1983) werden zur Sauerstoffentfernung als Korrosionsschutz in Heizwasserboilern verwendet und kommerziell angeboten. Um die Sauerstoffentfernung der Fängerstoffe unter Biotransformationsbedingungen (35°C) zu charakterisieren und den Verlust an Fängerstoff abzuschätzen, wurde der 50-mL-Biotransformationsreaktor gegen einen einfachen 70-mL-Reaktor mit einer einzigen Zugangsöffnung ausgetauscht. Dieser wurde mit einem PTFE-Septum verschlossen, sodass der Luftaustausch mit der Umgebung minimiert war.

Die Sauerstoffentfernung durch Carbohydrazid wurde bei unterschiedlichen Temperaturen bestimmt (Abschnitt 0), währenddessen zum Vergleich die Bestimmung für Semicarbazid nur bei 35 °C erfolgte (Abb. 43).

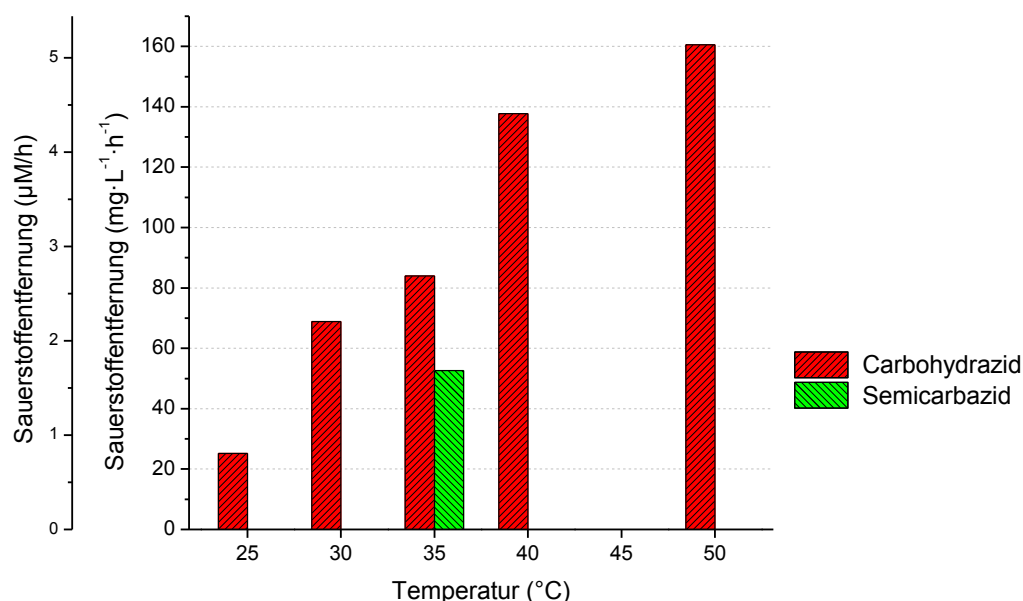


Abb. 43: **Temperaturabhängige Sauerstoffentfernung durch Carbohydrazid und Semicarbazid**; gleiche Skalierung der Ordinatenachsen (74 mL Reaktorvolumen, 500 mM Fängerstoff, 500 rpm)

Carbohydrazid erwies sich als schneller und effizienter Sauerstoffentferner, während Semicarbazid bei 35°C nur 63 % der Sauerstoffentfernung von Carbohydrazid erreichte (Abb. 43). Somit kann die sauerstofflabile GDHt durch die Fängerstoffzugabe neben dem toxischen Produkt 3HPA zusätzlich auch vor Sauerstoff effektiv geschützt werden. Carbohydrazid zeigte dabei erneut eine bessere Effizienz als Semicarbazid.

3.7 Nebenproduktbildung

3.7.1 Enzymatische Dismutation von 3HPA zu 1,3-PDO und 3HP

In der Literatur (Talarico et al., 1988; Sobolov und Smiley, 1960) wurde bereits von einer Dismutation des Aldehyds 3HPA als Folgereaktion berichtet. Bei dieser wahrscheinlich enzymatisch katalysierten Redoxreaktion wird der korrespondierende Alkohol 1,3-PDO und die korrespondierende Säure 3HP in äquimolaren Verhältnissen gebildet. Jedoch wurde in keinem der Belege ein Fängerstoff verwendet. In einer Repeated-Batch-Biotransformation sollte der Einfluss des Fängerstoffs Carbohydrazid auf dieses Nebenproduktverhältnis überprüft werden.

Bei der Repeated-Batch-Biotransformation mit LentiKats® und 520 mM Carbohydrazid (Abschnitt 3.4.2) konnte über die gesamte Dauer von 10 Zyklen neben der 3HPA-Produktion (Abb. 44 A) eine 1,3-PDO- und 3HP-Bildung beobachtet werden (Abb. 44 B). Während 1,3-PDO mittels HPLC quantifiziert wurde, erfolgte die Bestimmung der 3HP über die Annahme, dass die gebildete 3HP-Menge der verbrauchten Menge KOH entspricht (Abb. 49 A). Zusätzlich kam es bei jedem neuen Zyklus zu einer Verschleppung von 1,3-PDO, da zur Minimierung der Sauerstoffexposition kein Waschschriff der Immobilisate zwischen den einzelnen Zyklen eingefügt wurde. Die Normierung der 1,3-PDO-Konzentration der einzelnen Zyklen erfolgte durch die Korrektur mit der Anfangskonzentration vor dem Reaktionsstart mit Glycerin, während der Laugeverbrauch dabei auf Null gesetzt wurde.

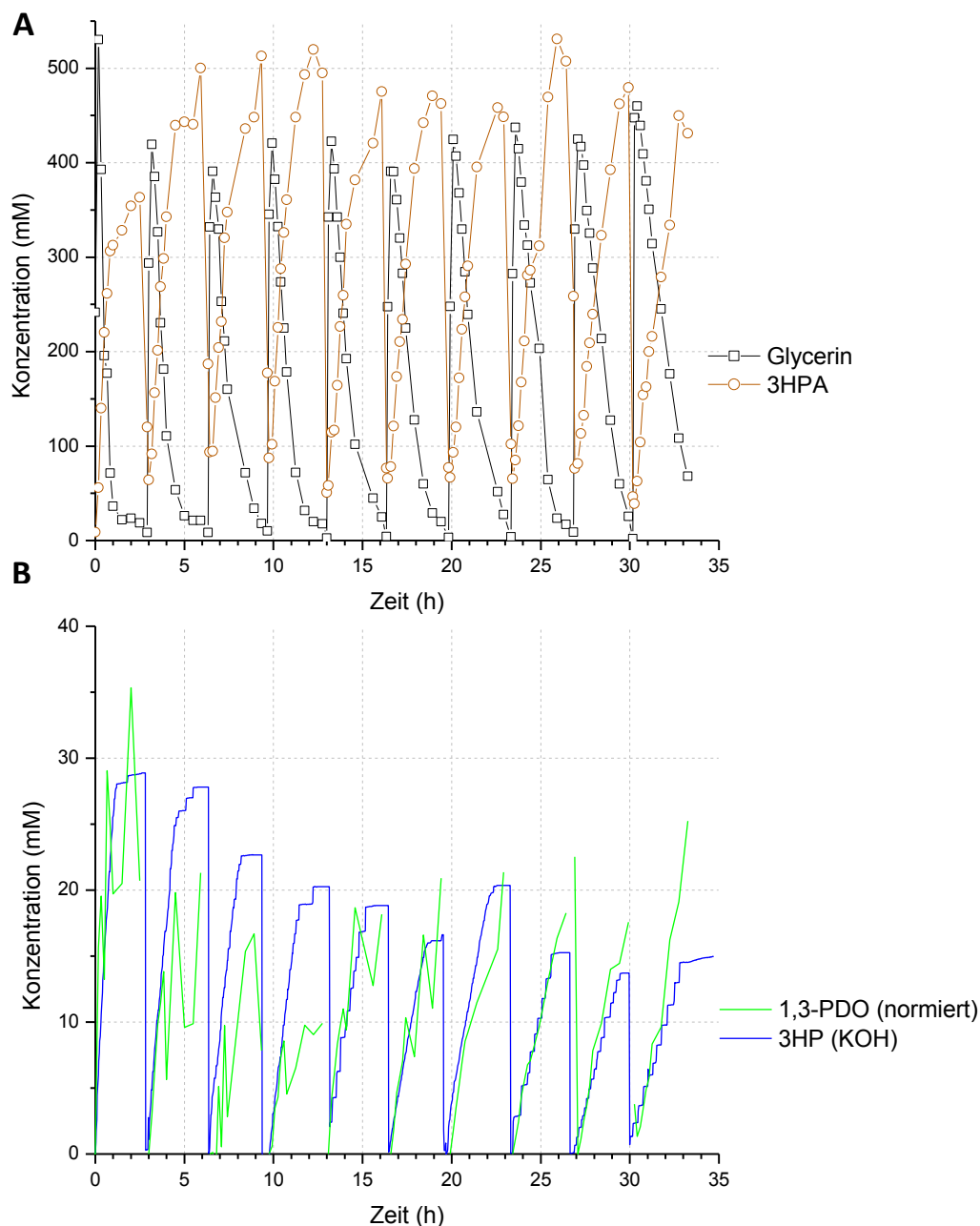


Abb. 44: **Repeated-Batch-Biotransformation mit *L. reuteri* in LentiKats® und 520 mM Carbohydrazid;** Konzentrationsverläufe von (A) Glycerin und 3HPA, (B) 3HP (KOH-Signal) und 1,3-PDO über 10 Zyklen, Wiederverwendung der Biomasse in jedem Zyklus (200 mL, 10 % (w/v) LentiKats®, 500 mM Glycerin, 35°C, pH 7, 500 rpm, anaerob)

Auch bei der Verwendung des Fängerstoffs Carbohydrazid erfolgte in der Biotransformation von Glycerin mit *L. reuteri* eine Folgereaktion des gebildeten 3HPA zu 1,3-PDO und 3HP. Abb. 44 B lässt die in der Literatur beschriebene äquimolare Bildung vermuten, jedoch ist der Konzentrationsverlauf für genauere Aussagen zu schwankend.

Aufgrund der schlechten Trennbarkeit des 3HP-Signals bzw. dessen Quantifizierung in der HPLC-Analytik wurde die Höhe des 3HP-Peaks (UVD) mit der Fläche des 1,3-PDO-Signals (RID) ins Verhältnis gesetzt (Abb. 45).

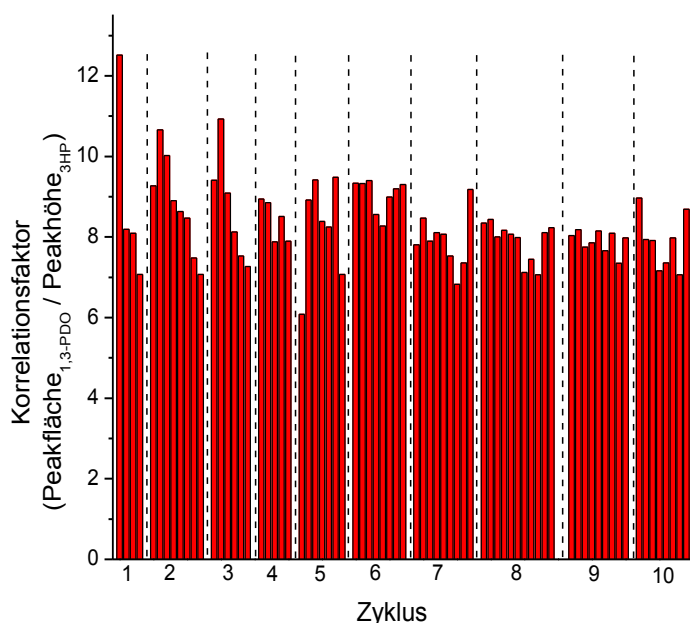


Abb. 45: **Korrelation von 3HP und 1,3-PDO**; Korrelationsfaktor von 1,3-PDO (Peakfläche, RID-Chromatogramm) und der 3HP (Peakhöhe, UVD-Chromatogramm) über 10 Zyklen Biotransformation mit *L. reuteri* bei Wiederverwendung der Immobilisate (10 % (w/v) LentiKats®, 500 mM Glycerin, 520 mM Carbohydrazid, 35°C, pH 7, 500 rpm, anaerob)

Der Korrelationsfaktor des 1,3-PDO- und 3HP-Signals zeigte über eine Biotransformationsdauer von 10 Zyklen mit Carbohydrazid ab dem 4 Zyklus ein annähernd konstantes Verhältnis (Abb. 45) und deutet somit auf einen direkten Zusammenhang der 1,3-PDO- und 3HP-Bildung hin.

3.7.2 Hemmung der Dismutation durch Fängerstoffe

Infolge der Verwendung des Fängerstoffs Carbohydrazid wird durch die Bildung des Carbazons 3HPA der Reaktion sofort entzogen und somit die Dismutation zu 1,3-PDO und 3HP unterbunden. Zur Überprüfung dieser These wurde die Nebenproduktbildung in den Biotransformationen der Glycerin- und Carbohydrazidoptimierung (Abschnitt 3.5.3) näher untersucht.

Während die 3HPA-Konzentration mittels colorimetrischen Tests quantifiziert wurde, erfolgte die 3HP-Bestimmung über die Gleichsetzung mit der der zugegebenen KOH-Konzentration (Abb. 46).

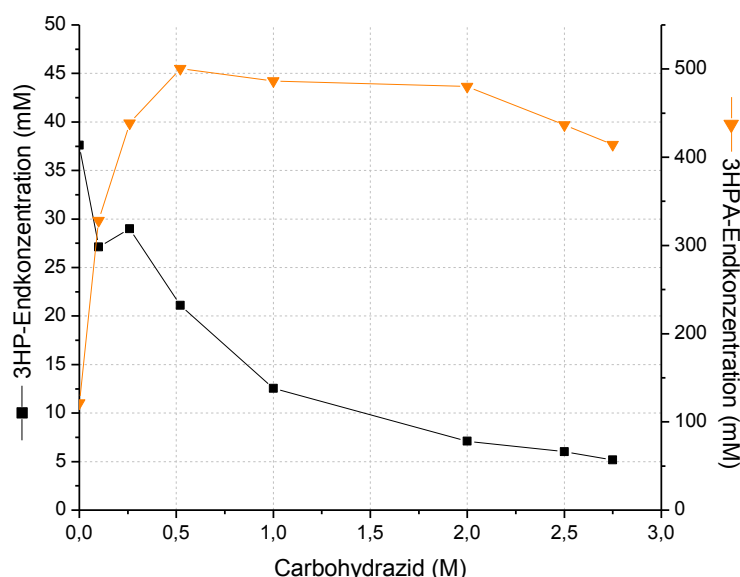


Abb. 46: **Einfluss der Carbohydrazidkonzentration auf die 3HP-Bildung**; Biotransformationen mit Zellsuspensionen von *L. reuteri*, Bestimmung der 3HP durch die verbrauchte KOH-Menge (10^{10} Zellen/mL, 500 mM Glycerin, 35°C, pH 7, 500 rpm, anaerob)

Bei konstanter Glycerinzugabe (500 mM) konnte eine Reduktion der Säureproduktion von 37,6 mM ohne Carbohydrazid auf 5,2 mM mit 2,75 M Carbohydrazid gemessen werden (Abb. 46). Dies ist eine Verringerung von 7,5 % auf 1 % im Vergleich zur eingesetzten Glycerinmenge. Legt man eine äquimolare Dismutation zugrunde, bedeutet dies eine Verringerung der Nebenprodukte 1,3-PDO und 3HP von 15 % auf 2 %. Aufgrund der versuchsbedingt enthaltenen Reduktionsäquivalente in der Zelle konnte die 1,3-PDO-Menge nicht herangezogen werden. Hier waren zum einen die 1,3-PDO-Bildung mittels Reduktionsäquivalenten durch die 1,3-PDO-Oxidoreduktase und zum anderen die 1,3-PDO-Bildung durch Dismutation überlagert.

3.7.3 Acroleinbildung als Artefakt während der Probenlagerung

In HPLC-Messungen kam es immer wieder bei 26 min zu einem Peak im UVD-Signal (210 nm), der als Acrolein identifiziert werden konnte. Acrolein zeigte bereits bei einer Zugabe von 2 mM im Biotransformationsansatz eine starke Hemmung auf die 3HPA-Produktion (Daten Creavis/Evonik). Nach Vollenweider et al. (2010) konnte in einem Test der minimalen Hemmkonzentration bei *Escherichia coli* (*E. coli*) eine vielfach stärkere Hemmwirkung von Acrolein als von 3HPA beobachtet werden. Deshalb musste geklärt werden, ob Acrolein als Nebenprodukt während der Biotransformation oder als ein artifizielles Produkt während der Probenvermessung in der HPLC entstand.

Bei der HPLC-Quantifizierung kam es aufgrund der Messdauer von 30 min pro Probe und einer Probenmenge von mindestens 20 Stück zu einer langen Verweilzeit im Autosampler. Dieser konnte nicht gekühlt werden und bei Messungen einer sehr großen Probenanzahl über Nacht lagerten die Proben bei Raumtemperatur (22°C) bis zu 14 h. Der Umstand, dass bei HPLC-Messungen, die nicht in der Beprobungsreihenfolge der Biotransformation gemessen wurden, auch der Acrolein-Gehalt unterschiedlich stark schwankte, legte die Schlussfolgerung einer standzeitbedingten nachträglichen Hydratisierung von 3HPA zu Acrolein nahe. Um dies zu untersuchen, wurde eine Biotransformationsprobe ohne Fängerstoff nach 30 min bzw. 60 min unter identischen Bedingungen erneut vermessen (Abb. 47).

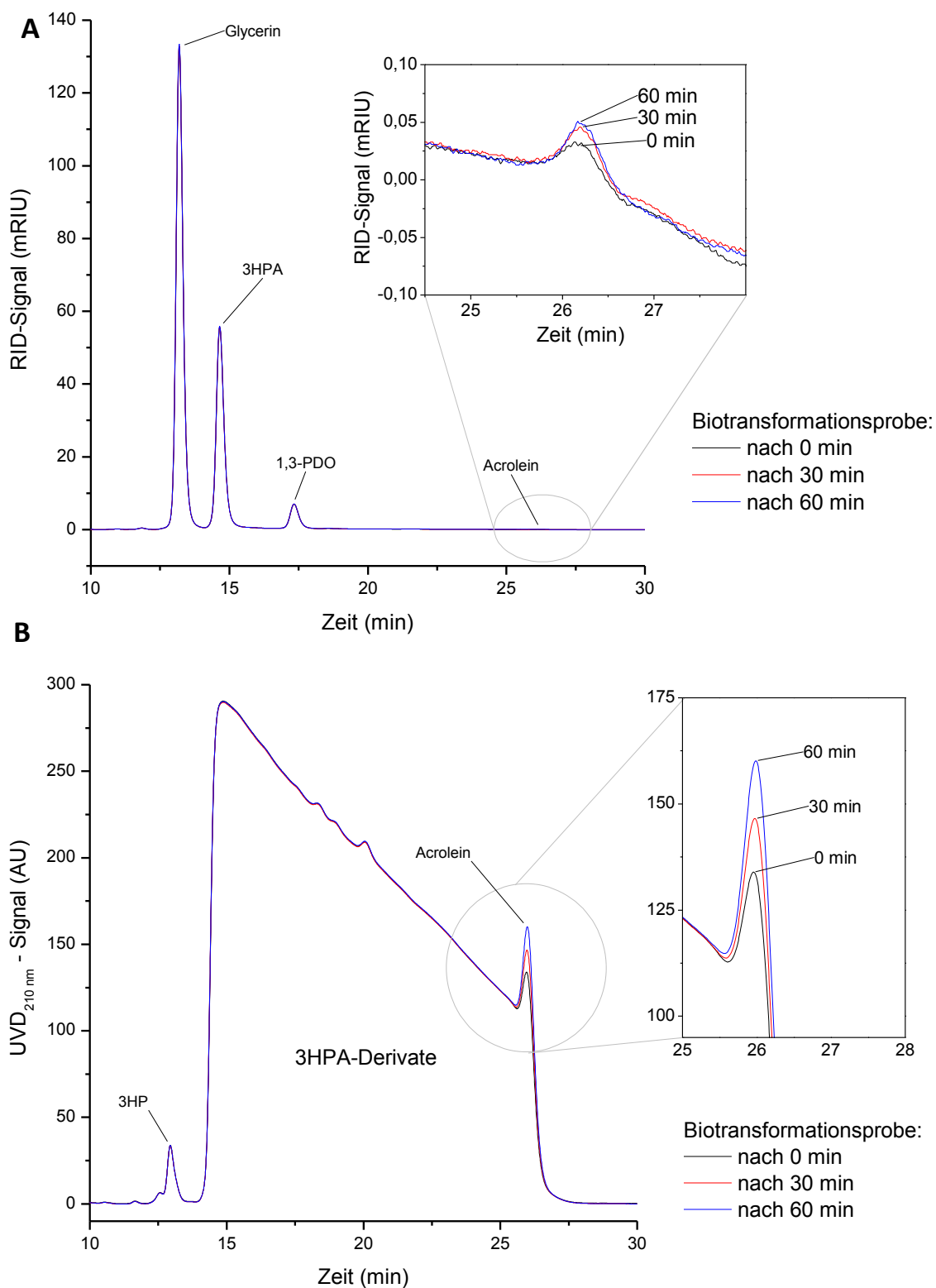


Abb. 47: **Acroleinbildung während der HPLC-Probenlagerung**; Lagerungsbedingter Abbau von 3HPA zu Acrolein im Autosampler der HPLC bei Raumtemperatur, Biotransformationsprobe nach 0, 30 und 60 min vermessen (A) RID- und (B) UVD-Chromatogramm (HPX-87H-Vorsäule (30x4,6 mm), HPX-87H-Hauptsäule (300x7,8 mm), 40°C, 0,6 mL/min 5 mM H₂SO₄, 10 µL Probenvolumen)

Es wurde ersichtlich, dass während der Lagerung im Autosampler in der Biotransformationsprobe die Konzentrationen von Glycerin, 3HPA und 1,3-PDO im RID-Chromatogramm konstant blieben (Abb. 47 A). Bei Acrolein hingegen konnte im UVD-Chromatogramm innerhalb von 60 min Lagerung im Autosampler eine Zunahme gemessen werden (Abb. 47 B), wobei der sehr geringe Signalunterschied im RID-Chromatogramm (Abb. 47 A) einen sehr geringen Anstieg der Acroleinkonzentration vermuten lässt.

Zusätzlich zeigte sich ein sehr ungewöhnliches UVD-Chromatogramm mit einem sehr breit ausgeprägtem Tailing (Abb. 47 B), das nach der Elution von 3HPA beginnt und über 13 min andauert. Hier wird eine Reaktion von 3HPA auf der HPLC-Säule unter HPLC-Bedingungen (40°C, pH 2) unter anderem zu Acrolein bzw. Polymerisierung vermutet.

3.7.4 Farbstoffbildung durch Carbohydrazidzugabe

Durch die Zugabe des Fängerstoffs Carbohydrazid kam es entgegen der Zugabe von Semicarbazid zusätzlich zu dem natürlichen Nebenproduktspektrum zu einer unbekannten Farbreaktion. Während die Kontrolle ohne Fängerstoff eine Gelbfärbung aufwies, zeigte sich keine Verfärbung bei der Zugabe von Semicarbazid. Durch die Verwendung von Carbohydrazid und Lagerung unter Sauerstoffeinfluss konnte indes eine violette Färbung der Biotransformationsbrühe beobachtet werden (Abb. 48). Diese violette Verfärbung tritt auch bei sofortiger Abtrennung der Biomasse durch Zentrifugation auf, jedoch nicht bei Lagerung unter Stickstoffatmosphäre (Daten nicht gezeigt).

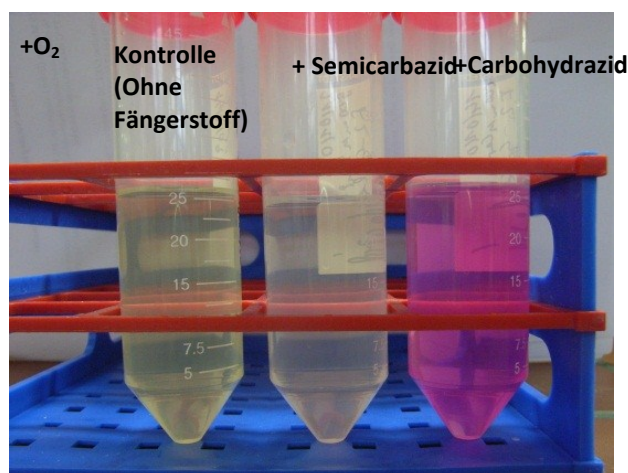


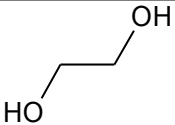
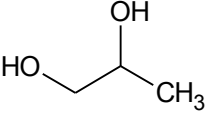
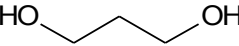
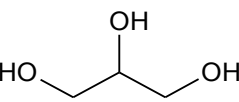
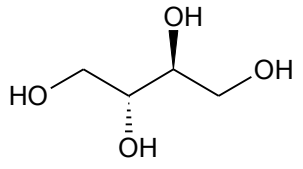
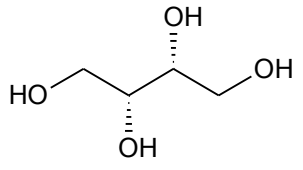
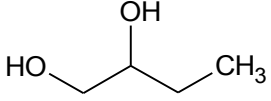
Abb. 48: **Farbreaktion der Biotransformationsbrühe mit Fängerstoffen**; (A) ohne Fängerstoff, (B) mit Semicarbazid und (C) mit Carbohydrazid bei Lagerung unter Sauerstoffatmosphäre

3.8 Alternative Substrate

Mehrere Autoren (Toraya et al., 1979; Abeles et al., 1960) beschrieben die Fähigkeit von *K. pneumoniae*, neben Glycerin auch 1,2-PDO und 1,2-EtOH verwerten zu können. Dabei wurden jeweils die intermediären Aldehyde (Propanal, Ethanal), die entstandenen korrespondierenden Säuren (Propionsäure, Essigsäure) und Alkohole (1-Propanol, Ethanol) nachgewiesen. Die Fähigkeit von *L. reuteri*, 1,2-PDO zu verwerten, wurde bereits von Sriramulu et al. (2008) publiziert. Für 1,2-EtOH, das strukturell ähnlich ist, liegen hingegen keine Daten vor. Um das Substratspektrum von *L. reuteri* näher zu untersuchen, wurden neben 1,2-PDO und 1,2-EtOH weitere Polyole getestet.

In einem Vorversuch wurden die verschiedenen Substrate (100 mM Endkonzentration, Tab. 12) in einem stehenden Batch-Ansatz (20 mL, 10^{10} Zellen/mL, 0,1 M KPP, pH 7, 35°C) auf deren Abbaubarkeit überprüft (Abschnitt 2.5.1).

Tab. 12: **Alternative Substrate für die Biotransformation mit *L. reuteri***; (+) Abbau erfolgt, (-) kein Abbau

Stoff	Strukturformel	Abbau
1,2-Ethandiol		+
1,2-Propandiol		+
1,3-Propandiol		-
Glycerin		+
Erythrit		-
Threit		-
1,2-Butanol		-

Es zeigte sich nur ein Abbau für Glycerin, 1,2-PDO und 1,2-EtOH. Ausgehend von diesen Daten wurden 1,2-PDO und 1,2-EtOH im Doppel-Fermenter-System mit Glycerin als Referenz näher untersucht (Abschnitt 2.5.2). In einem 50 mL Ansatz wurden die Stoffe in einer Konzentration von 500 mM eingesetzt und jeweils mit (Abb. 49) und ohne (Abb. 50) 520 mM Carbohydrazid getestet. Die Biotransformation erfolgte anaerob bei 35°C in 0,1 M KPP pH 7, bei 500 rpm und 10^{10} Zellen/mL.

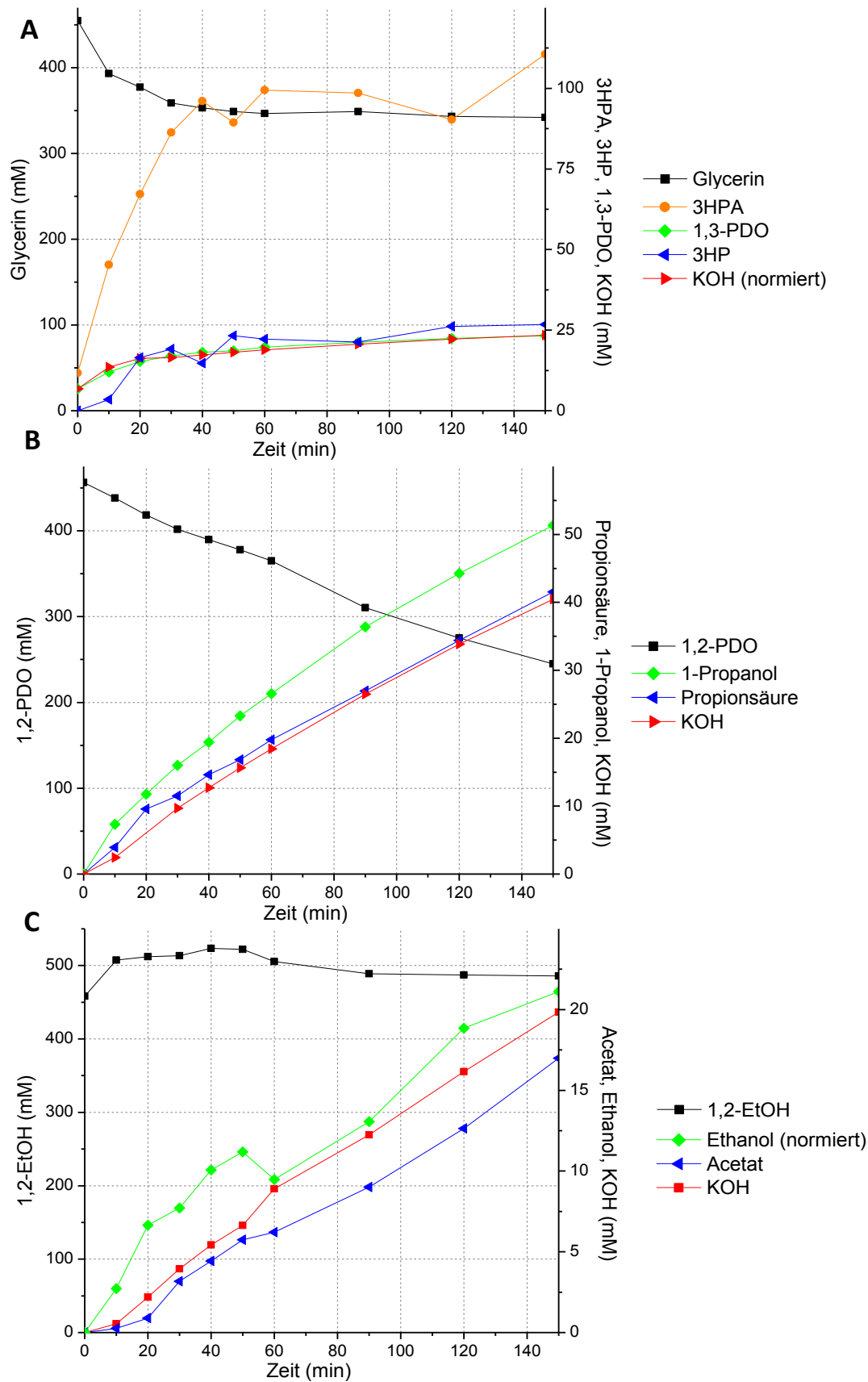


Abb. 49: Biotransformation alternativer Substrate von *L. reuteri* ohne Fängerstoffzugabe; (A) 500 mM Glycerin, (B) 500 mM 1,2-PDO, (C) 500 mM 1,2-EtOH (10^{10} Zellen/mL, 35°C, pH 7, 500 rpm, anaerob)

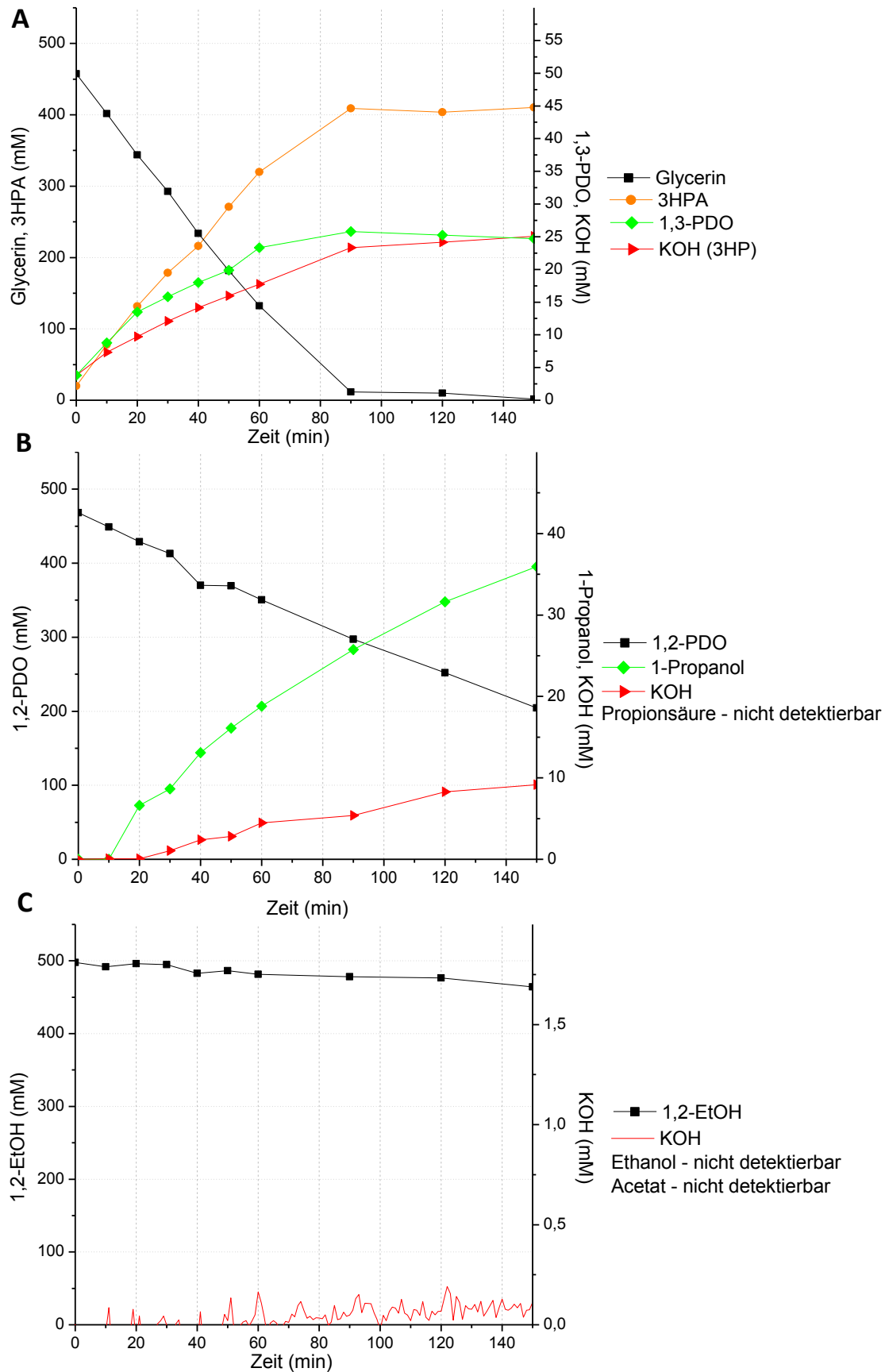


Abb. 50: **Biotransformation alternativer Substrate von *L. reuteri* mit Fängerstoffzugabe**; (A) 500 mM Glycerin, (B) 500 mM 1,2-PDO, (C) 500 mM 1,2-EtOH (10^{10} Zellen/mL, 520 mM Carbohydrazid, 35°C, pH 7, 500 rpm, anaerob)

Bei der Biotransformation ohne Carbohydrazidzugabe konnte in allen drei Ansätzen ein identischer Verlauf der verbrauchten Lauge (gravimetrische Bestimmung) und der gebildeten Säure (HPLC-Bestimmung) gezeigt (Abb. 49) und bezüglich 1,2-PDO und 1,2-EtOH eine erhöhte Menge an korrespondierendem Alkohol beobachtet werden. Interessanterweise stoppt im Gegensatz zu Glycerin als Substrat (Abb. 49 A) die Nebenproduktbildung bei dem Abbau von 1,2-PDO im beobachteten Zeitraum nicht ab (Abb. 49 B). Im Vergleich zu Glycerin verläuft der 1,2-PDO-Abbau langsamer, währenddessen bei 1,2-EtOH (Abb. 49 C) nur ein sehr geringer Abbau gemessen werden konnte. Für 1,2-PDO und 1,2-EtOH konnten die Aldehyd-Zwischenprodukte Propanal und Ethanal aufgrund einer unzureichenden Trennung in der HPLC-Analytik nicht quantifiziert werden (Abb. 54).

Bei der Biotransformation mit dem Fängerstoff Carbohydrazid zeigte sich für Glycerin und 1,2-PDO eine Verringerung der Nebenproduktbildungsgeschwindigkeit. Dabei konnte für Glycerin eine geringfügig höhere 1,3-PDO-Bildung im Vergleich zur 3HP (aus KOH-Daten bestimmt) gezeigt werden (Abb. 50 A). Wohingegen bei 1,2-PDO die unterschiedliche Alkohol- bzw. Säurebildung deutlicher ausgeprägt war (Abb. 50 B). Der Abbau von 1,2-EtOH war kaum nachweisbar (Abb. 50 C). Aufgrund des Abbruchs der Nebenproduktbildung bei Glycerinzugabe, dessen Ursache unbekannt ist, wurde der Einfluss von Carbohydrazid auf die Bildungsgeschwindigkeit der Nebenprodukte (Säure, Alkohol) anstelle der Endkonzentration untersucht. Dabei konnte eine deutliche Verringerung in allen drei Fällen gezeigt werden (Abb. 51).

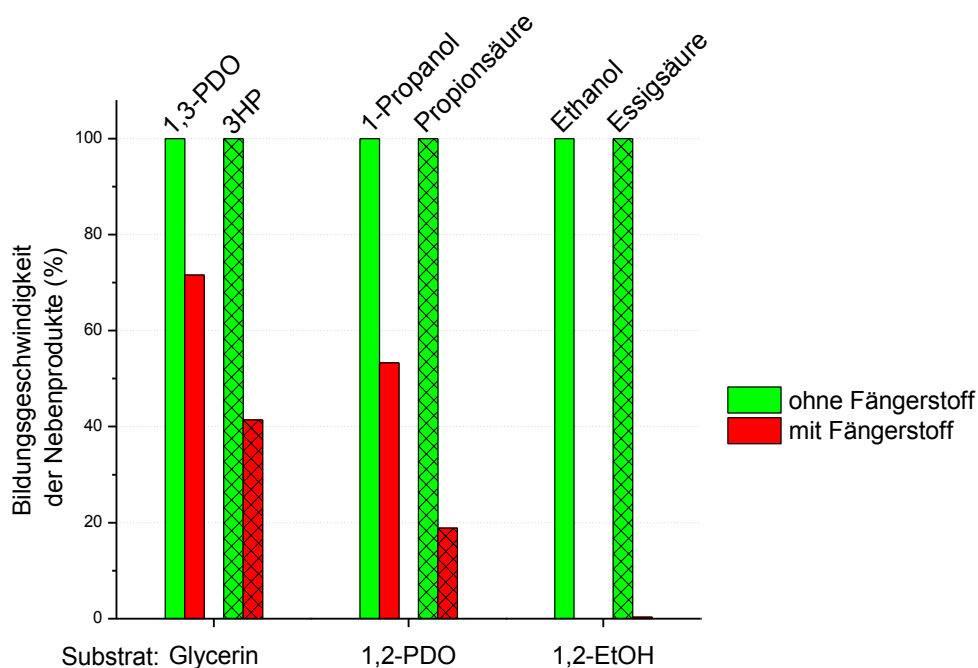


Abb. 51: **Hemmung der Nebenproduktbildung durch Zugabe von Carbohydrazid**; Reduktion der Bildungsgeschwindigkeit der korrespondierenden Säure und des Alkohols aus den jeweiligen Aldehyden durch die Zugabe von 520 mM Carbohydrazid (500 mM Substrat, 10^{10} Zellen/mL, 35°C, pH 7, 500 rpm, anaerob)

Auffallend bei diesen Ergebnissen ist eine unterschiedliche Hemmung der Alkohol- und der Säurebildung. In Abschnitt 3.7.1 wird dem entgegen eine äquimolare, gekoppelte Bildung vermutet wobei diese in einem Repeated Batch nach dem 4. Zyklus beobachtet wurde. In dem ersten Zyklus zeigte sich analog zu diesem Versuch eine Überproduktion an 1,3-PDO (Abb. 44 B), die auf zelleigene Reduktionsäquivalentereserven zurückzuführen ist und die Bestimmung der Alkoholbildungsgeschwindigkeit beeinflussten.

3.9 Analytik

3.9.1 HPLC

Die HPLC-Analytik erwies sich als anspruchsvoll. Grundlegend konnte, je nach Versuch (Biotransformation (Abb. 52), Fermentation (Abb. 53), alternative Substrate (Abb. 54)), eine ausreichende Trennung erzielt werden, jedoch war die Bestimmung der Aldehyde problematisch. Unter den verwendeten HPLC-Bedingungen (HPX-87H, 40°C, 0,6 mL/min 5 mM H₂SO₄) zeigte sich für 3HPA ein ungewöhnliches UVD-Chromatogramm (Abb. 52 B). Es war nicht möglich 3HPA und Acetat sicher zu trennen. Aus diesem Grund konnte 3HPA bei Anwesenheit von Acetat nur durch den colorimetrischen Test bestimmt werden, wohingegen keine Quantifizierung von Acetat mittels HPLC möglich war. Bei einer Biotransformation mit Glycerin ohne Glucose tritt Acetat nicht auf, weshalb sich dies nicht in der HPLC nachteilig auswirkte. Durch den Einsatz der Fängerstoffe wurde zusätzlich das Säulenmaterial der HPX-87H negativ beeinflusst, sodass 3HPA ausschließlich durch den colorimetrischen Test bestimmt werden musste und alternative Nachweismethoden untersucht wurden. Fernerhin zeigten sich weitere Stoffe, deren Herkunft, ob biologisch oder chemisch, nicht eindeutig zuordenbar war.

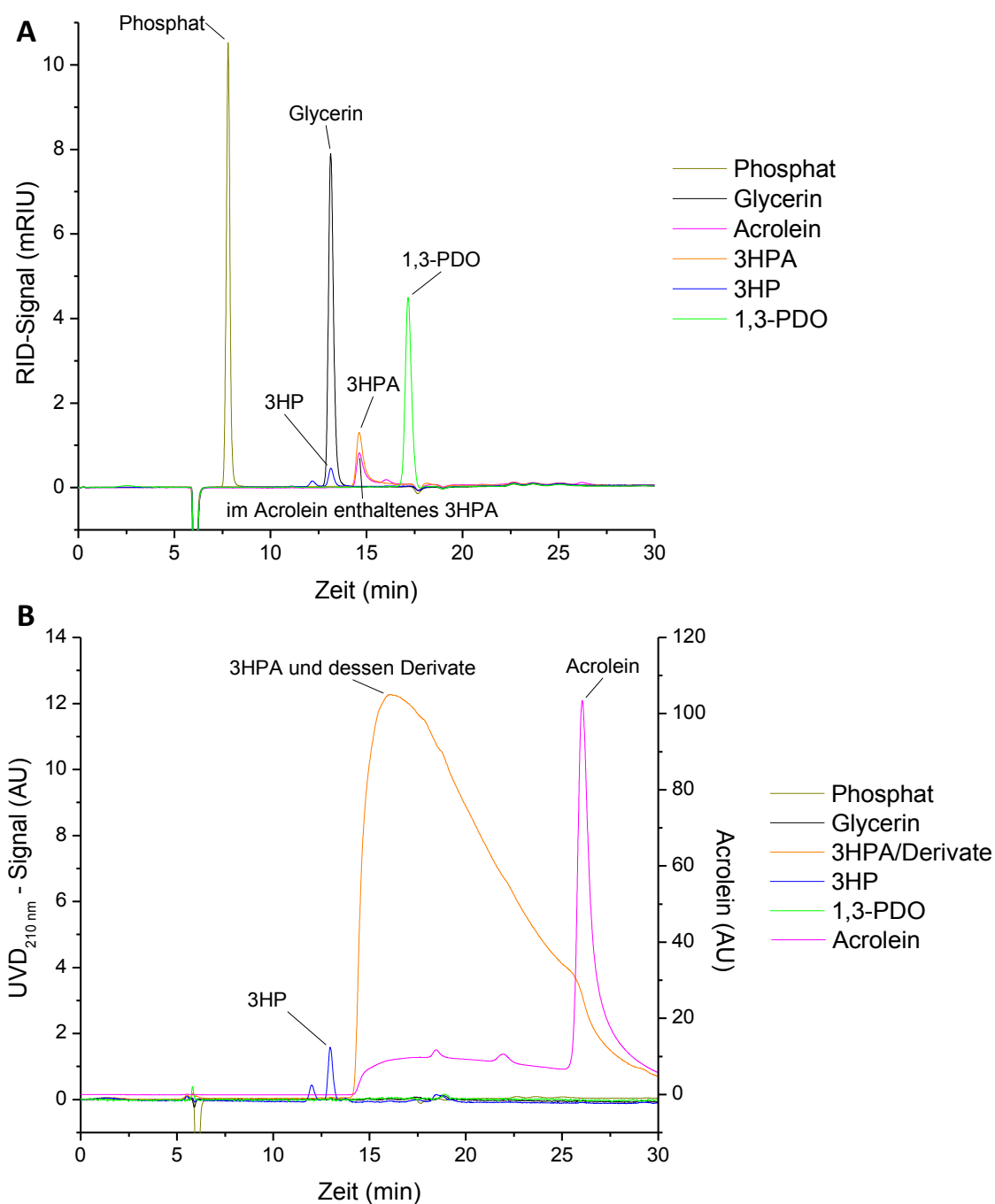


Abb. 52: **Auftrennung biotransformationsrelevanter Stoffe mittels HPLC**; Chromatogramme (A) des RI- und (B) des UV-Detektors, Acroleinprobe enthält chemisch bedingt 3HPA, 3HPA-Biotransformationsprobe ohne Fängerstoff (HPX-87H-Vorsäule (30x4,6 mm), HPX-87H-Hauptsäule (300x7,8 mm), 40°C, 0,6 mL/min 5 mM H₂SO₄, 10 µL Probenvolumen, 10 mM Standardlösungen)

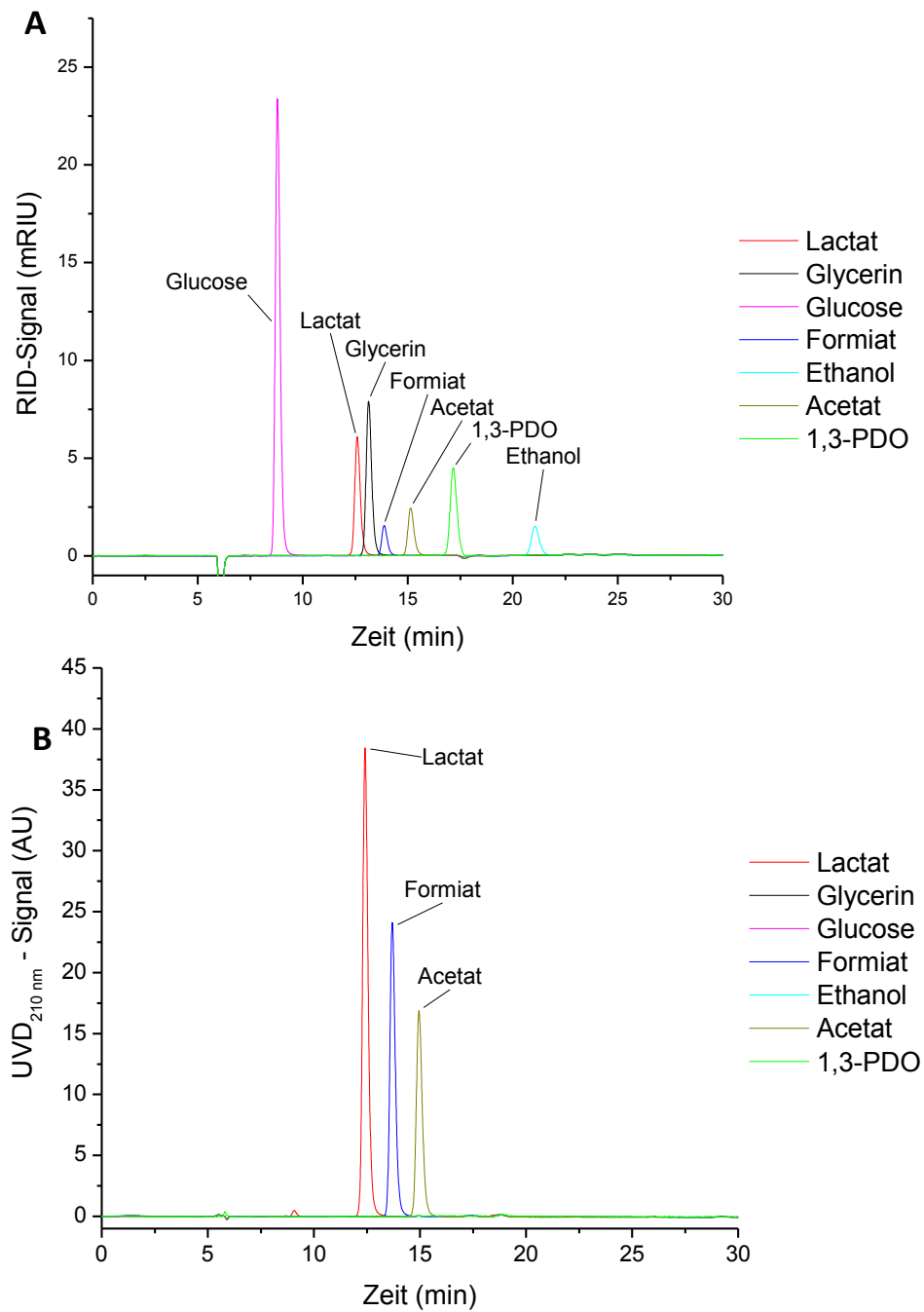


Abb. 53: **Auftrennung fermentationsrelevanter Stoffe mittels HPLC**; Chromatogramme (A) des RI- und (B) des UV-Detektors (HPX-87H-Vorsäule (30x4,6 mm), HPX-87H-Hauptsäule (300x7,8 mm), 40°C, 0,6 mL/min 5 mM H₂SO₄, 10 µL Probenvolumen, 10 mM Standardlösungen)

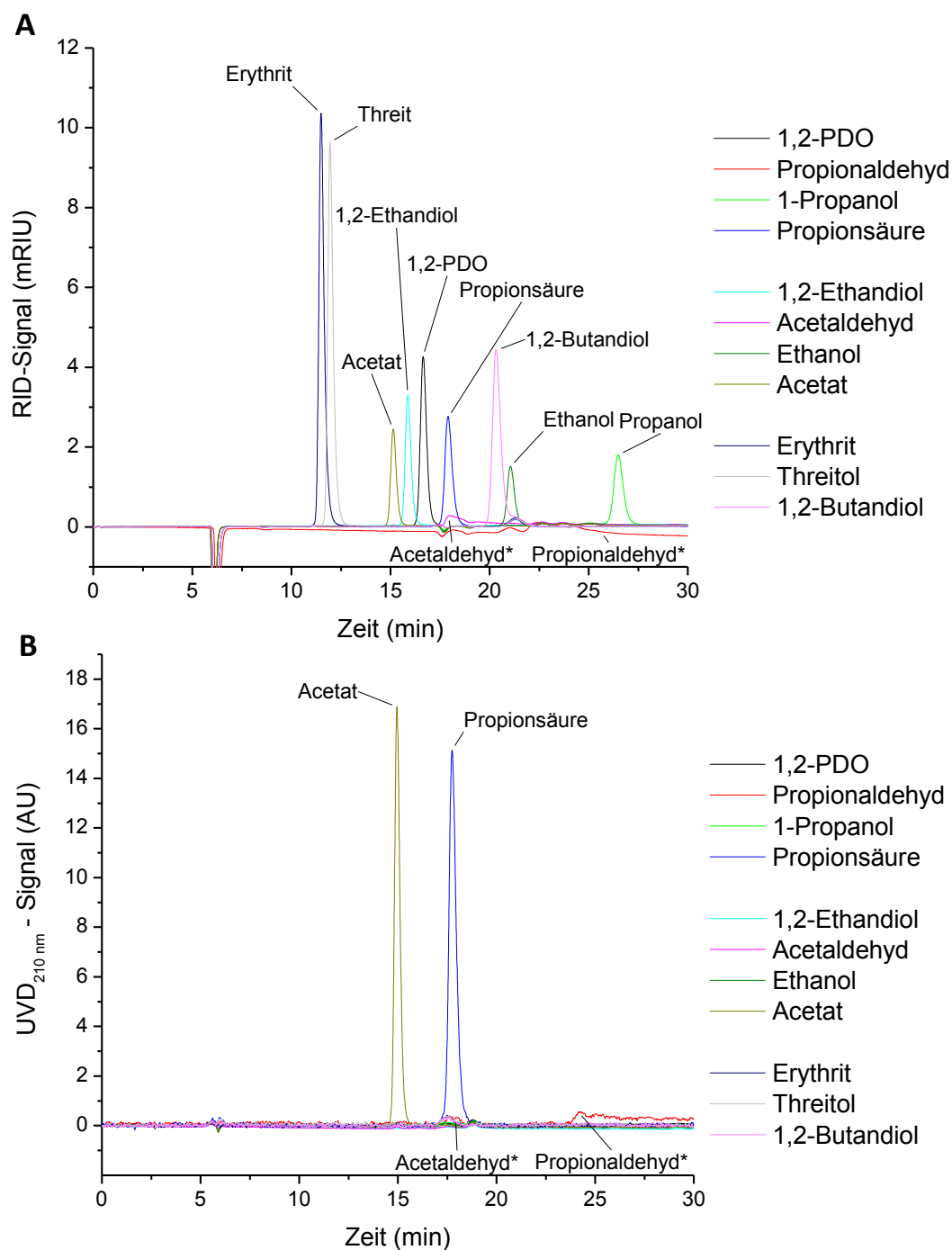


Abb. 54: **Auftrennung alternativer Substrate und deren Folgeprodukte mittels HPLC**; Chromatogramme (A) des RI- und (B) des UV-Detektors, (*) keine quantitative Analyse aufgrund schlechter Trennung (HPX-87H-Vorsäule (30x4,6 mm), HPX-87H-Hauptsäule (300x7,8 mm), 40°C, 0,6 mL/min 5 mM H₂SO₄, 10 µL Probenvolumen, 10 mM Standardlösungen)

Für eine schnelle HPLC-Bestimmung der Glucosekonzentration während der Biomasseherstellung wurden, wie in Abschnitt 2.7.1.2 beschrieben, zwei HPX-87H-Vorsäulen unter identischen Elutionsbedingungen verwendet. Hierbei konnte bei der Vermessung einer 10fach verdünnten Fermentationsprobe eine Verkürzung der Glucosebestimmung auf 2 min erreicht werden (Abb. 55).

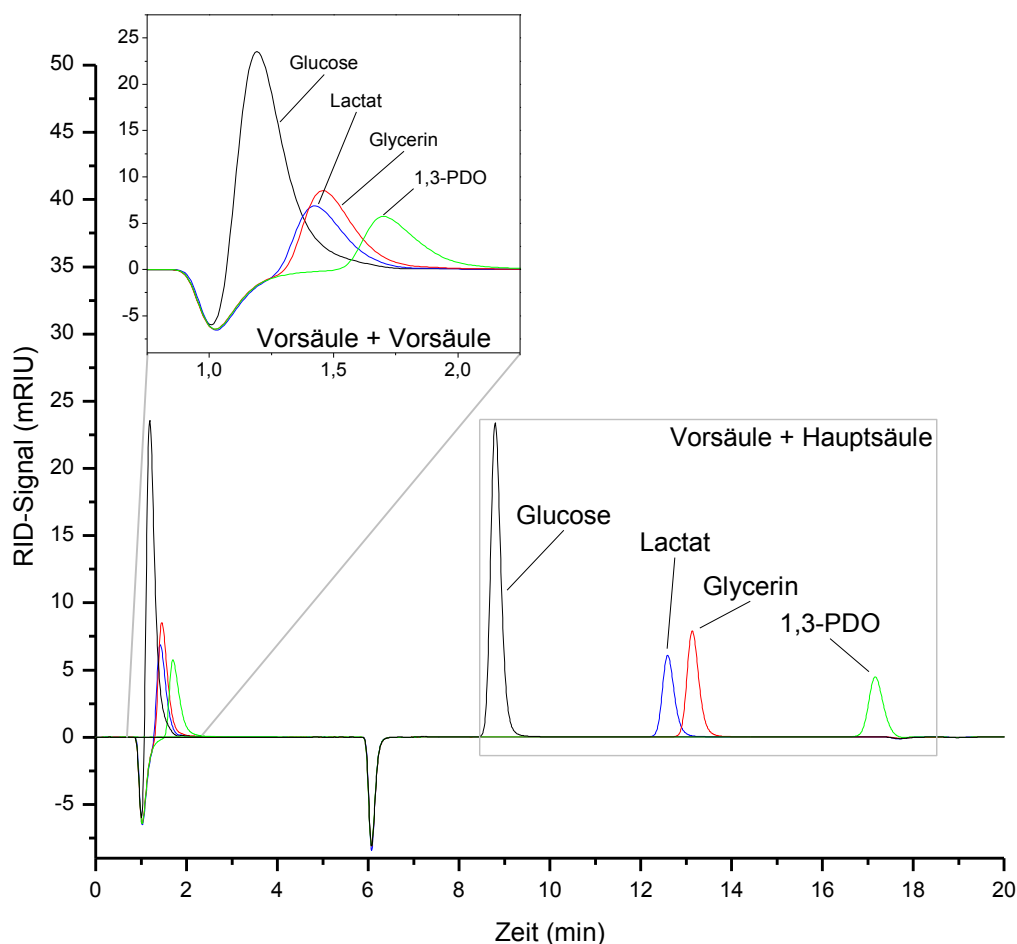


Abb. 55: **Verkürzte Glucosebestimmung mittels zweier HPX-87H Vorsäulen im Vergleich zur Standardanalytik;** HPLC-Chromatogramm des RI-Detektors im Vergleich zur herkömmlichen Analytik (HPX-87H-Vorsäule (30x4,6 mm), HPX-87H-Hauptsäule (300x7,8 mm), 40°C, 0,6 mL/min 5 mM H₂SO₄, 10 mM Standardlösungen)

Durch diese HPLC-Methode konnte die Glucosebestimmung von zwei Proben bei einer Doppelfermentation auf insgesamt 5 min reduziert und somit zeitnah die Glucose-Glycerin-Feed-Lösung bei Bedarf der Fermentation zugeführt werden. Die Grenze dieser Methodik liegt bei fortschreitender Fermentation in der Bildung von Lactat. Dabei wird durch die ungenügende Trennung der Signale die Glucosekalibrierung beeinflusst. Dieser Einfluss kann aber über das UVD-Signal von Lactat korrigiert werden.

3.9.1.1 Bestimmung der 3-Hydroxypropionsäure

Bei der Biotransformation von Glycerin zu 3HPA mit *L. reuteri* entstehen zusätzlich Nebenprodukte. Zum einen entsteht 1,3-PDO, das verlässlich durch die HPLC quantifiziert werden konnte und zum anderen eine Säure, die eine Gegentitrierung erforderte, um den pH-Wert konstant zu halten. Bereits Sobolov und Smiley (1960) und Talarico et al. (1988) hatten diese Säure als 3HP identifiziert.

Zur Überprüfung der Retentionszeit und der Quantifizierung der 3HP wurde ein 3HP-Standard (TCI Deutschland GmbH, Eschborn, Dtl.) mittels HPLC unter Standardbedingungen (Abschnitt 2.7.1.1) vermessen (Abb. 56).

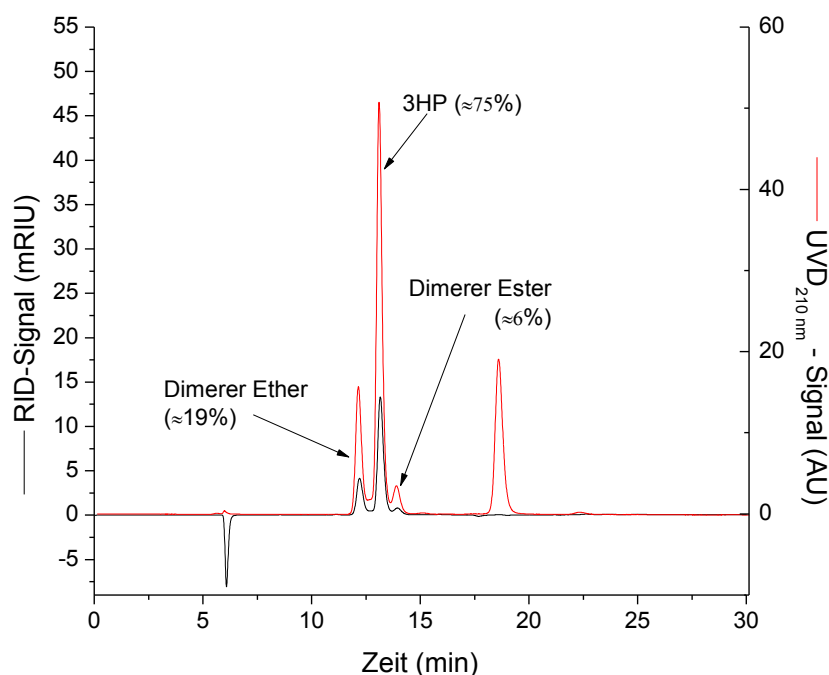


Abb. 56: **Identifizierung der 3HP-Retentionszeit im HPLC-Chromatogramm mit Massenverteilung der NMR-Analyse**; Chromatogramm einer 100 mM 3HP-Standardlösung (HPX-87H-Vorsäule (30x4,6 mm), HPX-87H-Hauptsäule (300x7,8 mm), 40°C, 0,6 mL/min 5 mM H₂SO₄)

Dieser Standard zeigte jedoch multiple Signale (Abb. 56), die nicht eindeutig zuordenbar waren. Erst durch eine nachfolgende NMR-Analyse (Daten Creavis/Evonik) konnten die einzelnen Signale im RID-Chromatogramm aufgrund der Massenverteilung bestimmt werden. Dabei wurde 3HP der Retentionszeit von 13,15 min mit 75% Massenanteil zugeordnet (Abb. 56). Anhand der hier ermittelten Retentionszeit und einer Standardaddition muss das Vorhandensein der 3HP in einer Biotransformationsprobe überprüft werden.

Durch die Standardaddition von 3HP zu einer Biotransformationsprobe ohne Fängerstoff konnte 3HP nachgewiesen und sicher einem Signal sowohl im RID- (Abb. 57 A) als auch im UVD-Chromatogramm (Abb. 57 B) zugeordnet werden. Dabei zeigte sich eine nahezu zeitgleiche Elution von Glycerin und 3HP, wodurch das gemessene Glycerin korrigiert werden musste. Über das UVD-Signal der 3HP konnte deren Fläche im RID-Signal berechnet und die RID-Fläche des Glycerins mit dieser korrigiert werden. Die in dem 3HP-Standard (TCI, Eschborn, Dtl.) enthaltenen Ether und Ester der 3HP konnten in der Biotransformationsprobe hingegen nicht nachgewiesen werden.

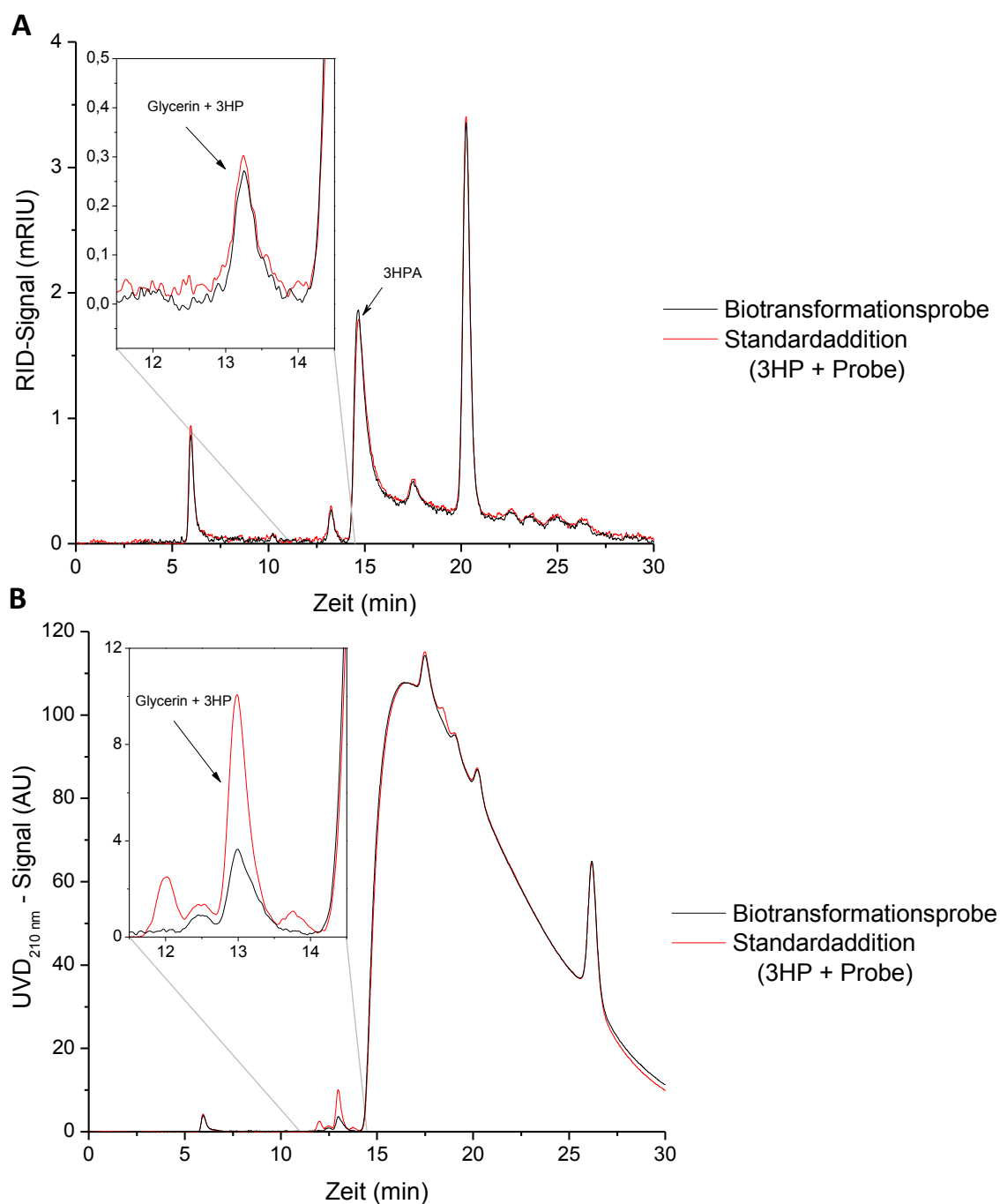


Abb. 57: **3HP-Standardaddition**; HPLC-Chromatogramm des (A) RID- und (B) des UVD-Signals (210 nm) der Biotransformationsprobe mit und ohne Standardaddition von 3HP (HPX-87H-Vorsäule (30x4,6 mm), HPX-87H-Hauptsäule (300x7,8 mm), 40°C, 0,6 mL/min 5 mM H₂SO₄)

Die Quantifizierung wurde durch eine weitere Koelution eines unbekannten Stoffes erschwert (Abb. 58). Aus diesem Grund wurde 3HP über die Höhe des UVD-Signals bestimmt. Zur zusätzlichen Kontrolle der HPLC konnte die verbrauchte Menge an KOH als Maß der 3HP-Produktion herangezogen werden.

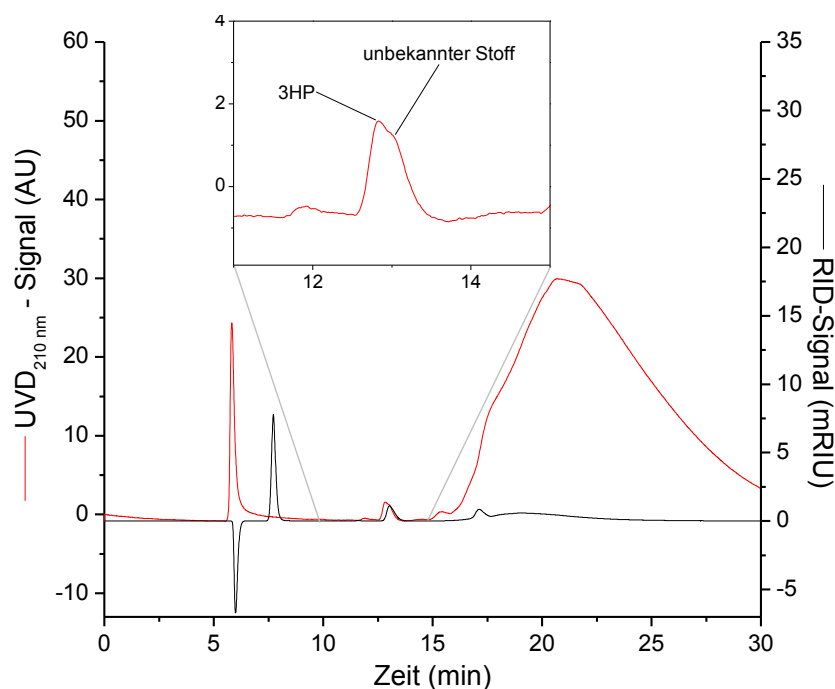


Abb. 58: **Koelution eines unbekannten Stoffes mit 3HP**; HPLC-Chromatogramm des UVD (210 nm) und des RID-Signals einer Biotransformationsprobe (HPX-87H-Vorsäule (30x4,6 mm), HPX-87H-Hauptsäule (300x7,8 mm), 40°C, 0,6 mL/min 5 mM H₂SO₄)

3.9.1.2 Verlust der HPLC-Trennungseigenschaften durch Hydrazide

Der Hersteller (BioRad, München, Deutschland) des benutzten HPX-87H Säulenmaterials warnt explizit vor der Verwendung von aminogruppenhaltigen HPLC-Proben, da diese irreversibel mit dem Säulenmaterial interagieren (Guidelines for Use and Care of Aminex[®] Resin-Based Columns, BioRad, München, Deutschland). Aufgrund der zwei vorhandenen freien Aminogruppen des Fängerstoffs Carbohydrazid musste dies untersucht werden.

In einem Versuch wurden zwei HPX-87H Vorsäulen (30 x 4,6 mm) in Reihe geschaltet (40°C, 0,6 mL/min, 10 µL Injektionsvolumen). Als mobile Phase diente 5 mM H₂SO₄ mit 50 mM Carbohydrazid. Nach der Sättigung der Säulen für 48 h wurde auf die reguläre mobile Phase (5 mM H₂SO₄) gewechselt und erneut die Trennungseigenschaften untersucht (Abb. 59). Als Testsubstanz diente ein Mischstandard von 10 mM 1,3-PDO und 10 mM Glycerin

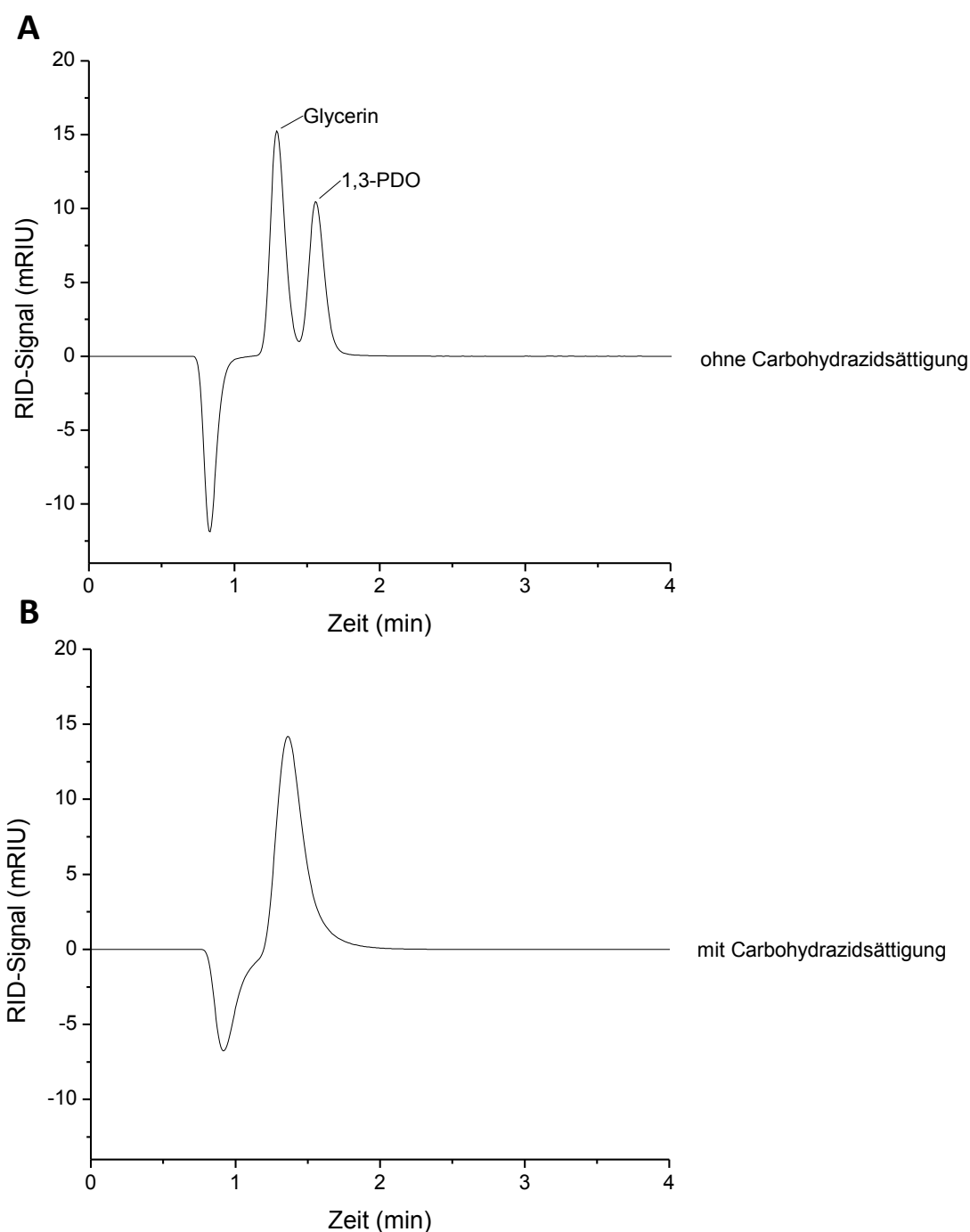


Abb. 59: **Verlust der Trennungseigenschaften des HPX-87H-Säulenmaterials durch Carbohydrazid**; RID-Chromatogramm einer Mixstandardlösung (10 mM Glycerin, 10 mM 1,3-Propandiol) (A) vor und (B) nach Sättigung mit 5 mM H_2SO_4 plus 50 mM Carbohydrazid (HPX-87H-Vorsäule (30x4,6 mm), HPX-87H-Hauptsäule (300x7,8 mm), 40°C, 0,6 mL/min 5 mM H_2SO_4 , 10 μL Probenvolumen)

Unter den Standardbedingungen kann diese Anordnung verwendet werden, um Glycerin und 1,3-PDO ausreichend zu trennen (Abb. 59 A). Die Zugabe von Carbohydrazid in der mobilen Phase resultierte jedoch in einem Totalverlust der Trennungseigenschaften (Abb. 59 B). Durch die Interaktion von Carbohydrazid mit dem Säulenmaterial ist eine verlässliche Bestimmung von Glycerin und 1,3-PDO nur möglich, wenn in kurzen Intervallen (≈ 200 Proben) die kontaminierte Vorsäule ersetzt wird. Aufgrund des Tailings (Abb. 57 A) und der unbekannten Reaktionen von 3HPA während der HPLC-Analyse erfolgte die

Quantifizierung nur noch nasschemisch im colorimetrischen Test. Aufgrund dieser Ergebnisse sollten weitere HPLC-Trennmaterien auf ihre Trennungseigenschaften und Stabilität gegenüber Carbohydrazid untersucht werden.

3.9.1.3 Alternative HPLC-Analytik mit ODS-Hypersil

Aufgrund der Inkompatibilität des Fängerstoffs Carbohydrazid mit dem bisher eingesetzten HPLC-Material HPX-87H (BioRad, München, Deutschland) wurde die verwendete Schwefelsäure variiert (Konzentration, pH-Wert) und Reinigungsversuche (Spülung mit 30 mM Acetonitril bzw. 25 mM Schwefelsäure) unternommen. Dies führte aber zu keinem Erfolg. Daher wurden, auch in Hinblick auf die Kopplung der HPLC an ein Massenspektrometer, andere Säulenmaterialien und mobile Phasen getestet. Da bereits publizierte Anwendungen zur Analyse von DNPH-Aldehyd-Derivaten in Wasser- und Luftproben ein C₁₈-Säulenmaterial benutzen (Uebori und Imamura, 2004; Lehotay und Hromulakova, 1994), wurde zunächst eine C₁₈-Säule untersucht.

Die verwendete ODS-Hypersil-Säule 120A (125x4,6 mm) wurde mit einer mobilen Phase von 5 % Methanol in 0,1 M KPP pH 4,5 bei 30°C, 0,5 mL/min und 10 µl Probenvolumen (10 mM Standardlösungen) eingesetzt. Neben den kommerziell verfügbaren biotransformationsrelevanten Stoffen (Glycerin, 1,3-PDO, 3HP, Acrolein) wurde 3HPA nach Vollenweider et al. (2003) aufgereinigt und mit Carbohydrazid in den molaren Verhältnissen 1:1 (Fängerstoff in doppeltem Überschuss) und 2:1 (äquivalente Mischung von Aldehyd und Fängerstoff) untersucht (Abb. 60).

Erstmals gelang es in einer Mischung aus gereinigtem 3HPA und Carbohydrazid, die beiden möglichen Bindungsformen N,N-di- und N-mono-(3-Hydroxypropylaldehyd)-Carbohydrazon zu trennen. Bei der Vermessung derselben Proben im MS konnten die dazugehörigen Massen der Quasimoleküle des Protonadduktes von 147,1 m/z und 203,2 m/z und des Ammoniumadduktes von 164,2 m/z und 220,3 m/z gefunden werden (Abb. 29). Während Acrolein (6,8 min) sicher getrennt aufgelöst werden konnte (Abb. 60 B), ist es nicht möglich, das Edukt Glycerin, die Nebenprodukte 1,3-PDO und 3HP sowie das ungebundene Carbohydrazid aufgrund der Elution im Totvolumen zu trennen (Abb. 60). Somit ist diese Methodik nicht für eine vollständige Analyse aller Komponenten geeignet. Jedoch besteht ein großes Potential für eine Produkt-Onlineanalytik.

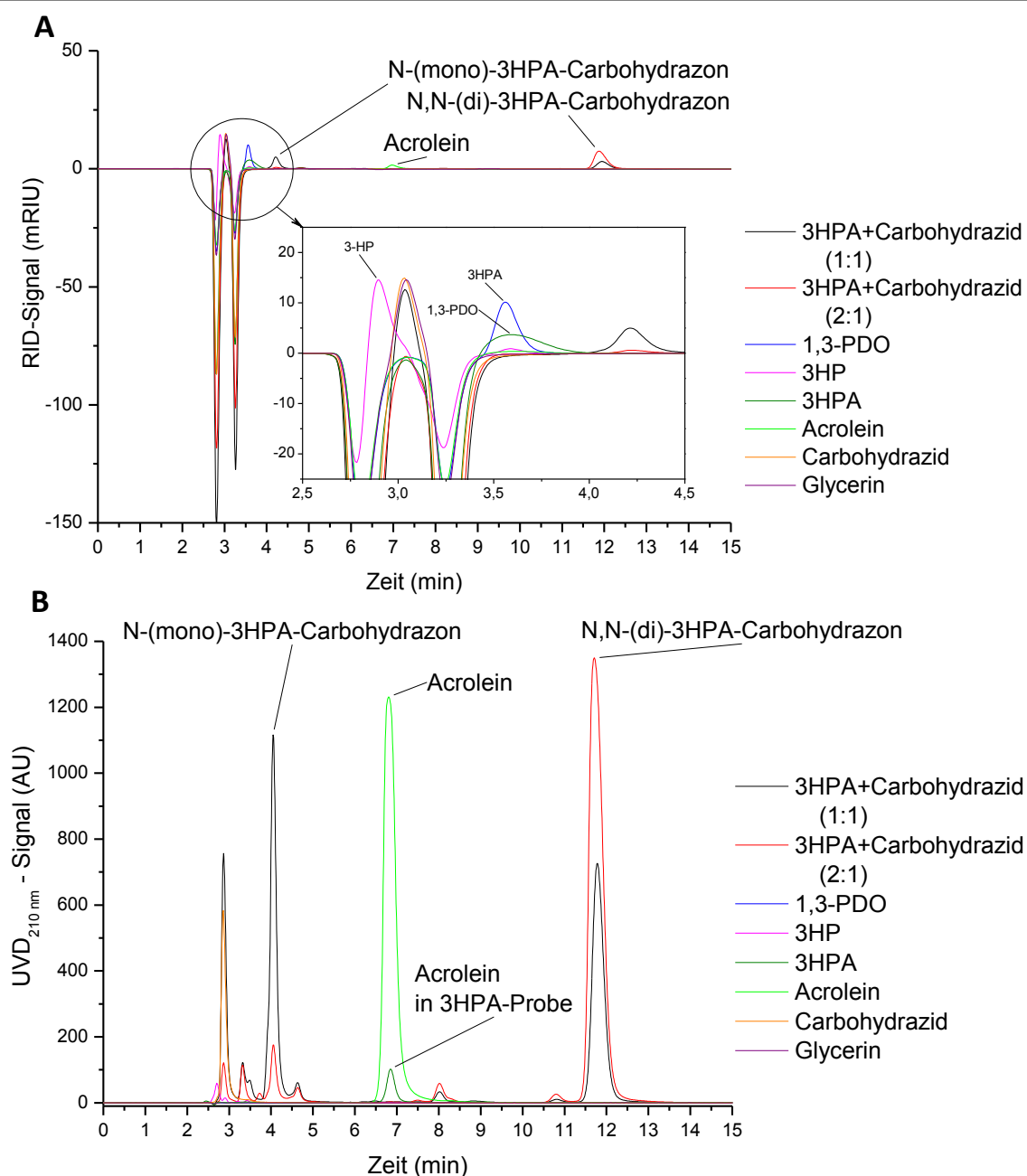


Abb. 60: **Alternative HPLC-Analytik mit ODS-Hypersil 120A**; Übersicht biotransformationsrelevanter Standardlösungen und deren Signale im (A) RI- und (B) UV-Detektor bei 210 nm (ODS-Hypersil-Säule 120A (125x4,6 mm), 0,5 mL/min 5 % Methanol in 0,1 M KPP pH 4,5, 30°C, 10 µl Probenvolumen)

3.9.2 Colorimetrischer Test

Anfänglich diente der colorimetrische Test zur Kalibrierung der HPLC. Aufgrund der problematischen 3HPA-Quantifizierung mittels HPLC durch den Einsatz von Fängerstoffen erfolgte die quantitative Analyse von 3HPA ausschließlich colorimetrisch. Durch eine Maßstabsverkleinerung (Abschnitt 2.7.3) konnte ein größerer Probendurchsatz trotz einer 3fachen Bestimmung erreicht werden.

3.9.2.1 Einfluss der Fängerstoffe auf den colorimetrischen Test

Angesichts der Probleme in der HPLC-Analytik durch den Einsatz der Fängerstoffe ist dieser Test von essentieller Bedeutung geworden. Durch die Dehydratisierung von 3HPA zu Acrolein und der anschließenden Farbstoffausbildung ist eine Beeinträchtigung durch die

Fängerstoffe nicht ausgeschlossen. Aus diesem Grund wurde der Einfluss der beiden eingesetzten Fängerstoffe Semicarbazid und Carbohydrazid auf den Test untersucht.

Hierfür wurden 5 Ansätze nach Tab. 13 unter biotransformationsnahen Bedingungen für 150 min bei 35°C inkubiert und im colorimetrischen Test vermessen (Abb. 61). Die dabei verwendete 3HPA-Biotransformationsprobe wurde zuvor in einer Biotransformation ohne Fängerstoffzugabe gewonnen und anschließend sterilfiltriert.

Tab. 13: Pipettierschema der einzelnen Ansätze für den colorimetrischen Test

Ansatz	Fängerstofffreie Biotransformationsprobe	Zugabe von	Gepuffert in
Kontrolle	2,5 mL (0,1 M 3HPA)	2,5 mL Wasser	0,1 M KPP pH 7
0,5 M Semicarbazid		2,5 mL 1 M Semicarbazid	
0,5 M Carbohydrazid		2,5 mL 1 M Carbohydrazid	
1 M Semicarbazid	-	5 mL 1 M Semicarbazid	
1 M Carbohydrazid	-	5 mL 1 M Carbohydrazid	

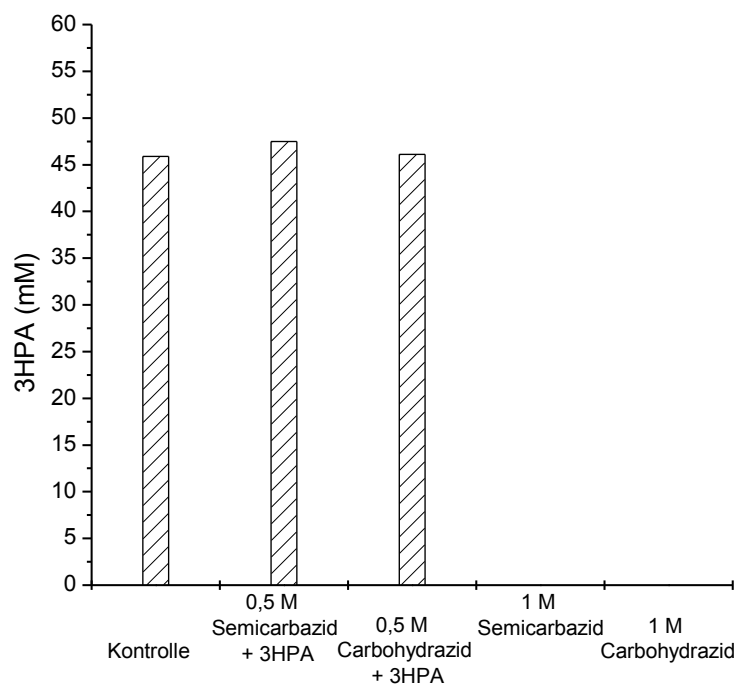


Abb. 61: Einfluss der Fängerstoffe auf den colorimetrischen Test; 0,5 M Fängerstoffkonzentration im Testansatz entsprechen bei einer regulären 1:100 Probenverdünnung 50 M im Probenansatz

Unter diesen Bedingungen haben weder Semicarbazid noch Carbohydrazid einen Einfluss auf den colorimetrischen Test gezeigt. Das vorhandene, an die Hydrazine gebundene 3HPA konnte als Acrolein wiedergefunden werden (Abb. 61). Weiterhin zeigten 1 M Semicarbazid und 1 M Carbohydrazid ohne Probe keine falsch-positiven Signale und macht den colorimetrischen Test zu einer robusten Quantifizierungsmethodik für 3HPA.

3.9.2.2 Einfluss erhöhter Aldehydmengen im colorimetrischen Test

Für den colorimetrischen Test wurde Acrolein als Standardreagenz verwendet. Optimaler Weise wird eine absolute Konzentration von 5 mM Acrolein im Test nicht überschritten, da ab dieser Konzentration keine lineare Korrelation mehr gegeben ist. Bei der Verwendung einer 10fachen statt der 100fachen Probenverdünnung wurde eine Orange-Färbung der Lösung beobachtet.

Um die Auswirkungen erhöhter Aldehydkonzentrationen zu untersuchen, wurde die absolute Konzentration von Acrolein auf bis zu 100 mM im Testansatz erhöht. Die jeweiligen Proben wurden colorimetrisch in Kunststoffküvetten bei 560 nm vermessen (Abb. 62).

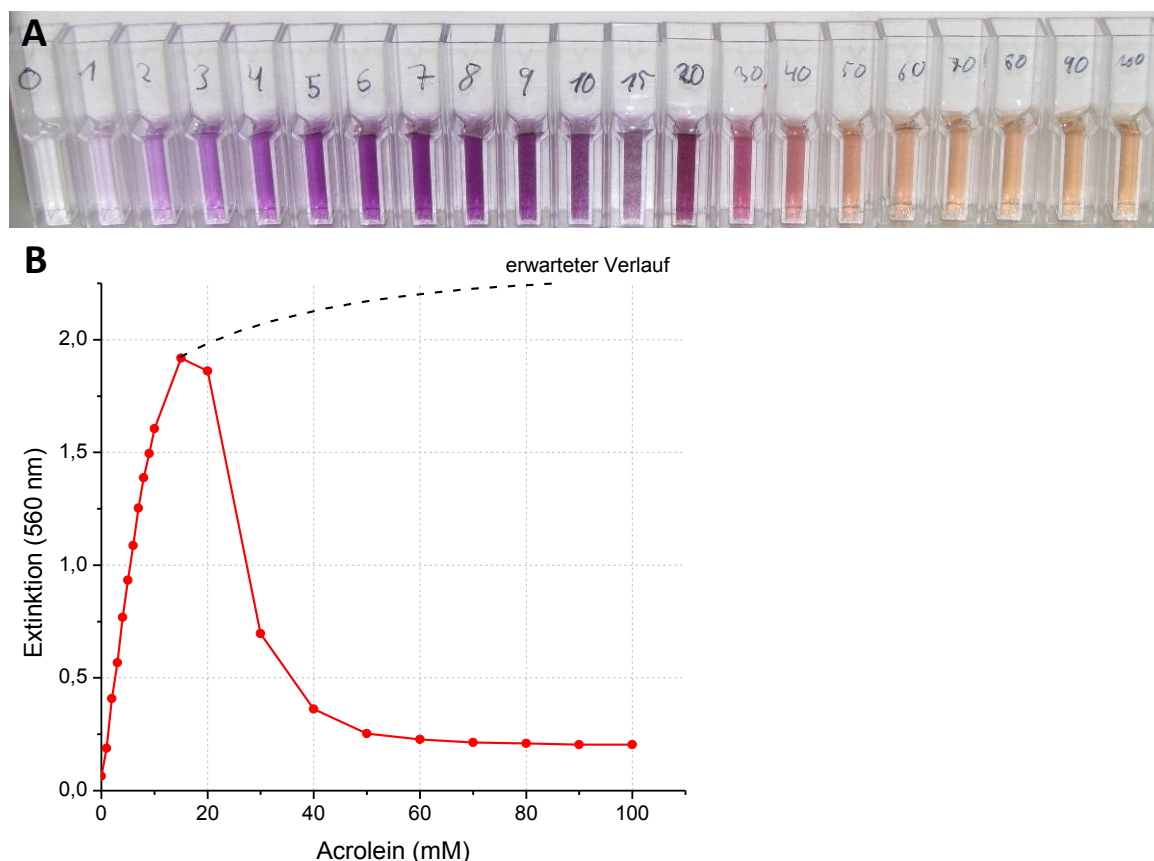


Abb. 62: Überprüfung der Messgrenze des colorimetrischen Tests; (A) Färbung des Testansatzes, (B) Extinktion bei 560 nm in Abhängigkeit von der Acroleinkonzentration

Ab einer Konzentration von 15 mM Acrolein konnte ein rapider Extinktionsabfall und ein Farbumschlag ab 40 mM beobachtet werden (Abb. 62). Außerdem zeigten diese Ergebnisse, dass es für eine Extinktion unter Umständen zwei Konzentrationswerte geben kann (z.B. entspricht $E_{560}=0,7$ 4 mM, aber auch 30 mM Acrolein). Daher darf die zu testende Aldehydkonzentration im colorimetrischen Test 15 mM nicht übersteigen.

4. Diskussion

4.1 Optimierung der Zellanzucht

Das anfänglich verwendete Protokoll (Creavis, Evonik Degussa GmbH, Marl, Dtl.) zur Anzucht von *L. reuteri* wurde erfolgreich unter strikt anaeroben Bedingungen optimiert. Sowohl durch die Verbesserung der Medienherstellung als auch der Nährstoffversorgung konnte die Biomasse mit einem Höchstmaß an GDHt-Aktivität produziert werden.

Die starke Verfärbung des kommerziellen Komplettmediums während der Sterilisation konnte durch die Zugabe einer separat autoklavierten Glucose/Glycerin-Lösung bei der eigenen Medienherstellung vollständig verhindert werden. Somit wurde auch eine mögliche Maillardreaktion (Heyns und Koch, 1970; Ellis, 1959; Hill und Patton, 1947; Maillard, 1912) vermieden, deren Reaktionsprodukte oder die daraus resultierende Nicht-Verfügbarkeit von Glucose bzw. Medienbestandteile (insbesondere Aminosäuren) sich negativ auf das Zellwachstum auswirkten (Abb. 18). Dies zeigte sich durch das bessere Wachstum. Eine getrennte Autoklavierung der Kohlenhydrate für die Anzucht von *L. reuteri* wurde bisher nur von wenigen Autoren bereits beschrieben (Rasch et al., 2002; Gänzle et al., 2000).

Die Etablierung der Fed-Batch-Fermentation zur Biomasseerhöhung erwies sich als anspruchsvoll, da eine kontinuierliche Zugabe der Substratlösung (Glucose/Glycerin) zu keinem weiteren Biomassezuwachs führte (Abb. 21). Dies belegt auch der Vergleich mit Literaturangaben (Tab. 14), bei denen die Biotrockenmasse von 2,5 g/L nicht überschritten wurde. Durch die substratgekoppelte Zugabe der komplexen Medienbestandteile Pepton, Fleisch- und Hefeextrakt konnte jedoch eine Erhöhung der Biomassekonzentration erzielt werden (Abb. 21, Abb. 22). Dabei wurde Fleischextrakt als der Medienbestandteil identifiziert, der essentiell für das Wachstum von *L. reuteri* ist. Die darin enthaltene nicht näher charakterisierte wachstumsrelevante Substanz kann von der Zelle nicht eigenständig unter den verwendeten Bedingungen synthetisiert werden. Dies wurde durch den sprunghaften Anstieg der Zelldichte bei der Fed-Batch-Fermentation (Abb. 23 A) nach der ersten Supplimentierungszugabe (5 h) verdeutlicht. Auch ein Mangel an Spurenelementen oder Vitaminen konnte ausgeschlossen werden (Abb. 21). Für eine Kostenreduktion in einer biotechnischen Anwendung muss die im kostenintensiven Fleischextrakt enthaltene fehlende essentielle Verbindung identifiziert und direkt als Reinstoff oder kostengünstigerer Komplexstoff dem Medium zugeführt bzw. durch genetische Modifizierung die benötigten Stoffwechselwege in *L. reuteri* ermöglicht werden. In der Literatur finden sich für Lactobacillen eine Vielzahl an Belegen für z.B. Aminosäureauxotrophien (Vogel et al., 2011; Hébert et al., 2004; van der Kaaij et al., 2004). Überraschenderweise fehlen diesen Bakterien de novo-Synthesewege für Porphyrine (Axelsson, 1998; Schlegel, 1992), obwohl Uroporphyrinogen-III, ein Zwischenprodukt der Porphyrinsynthese (Martens et al., 2002), gleichzeitig eine Ausgangsverbindung für die B₁₂-Synthese darstellt (Roth et al., 1996). Für *Lactococcus lactis* konnte durch eine exogene Porphyrinzugabe (Protoporphyrin IX) eine Wachstumsverbesserung und sogar eine Sauerstoffnutzung gezeigt werden (Gaudu et al., 2002; Duwat et al., 2001).

Tab. 14: Übersicht der Literaturangaben über die Biomasseproduktion von *L. reuteri* mit MRS-Medium (* approximiert)

Autor	Medium	Biomasse g BTM/L	g BTM/ g Glucose
Tobajas et al. (2007)	MRS (20 g/L Glucose, 40°C, pH 5,5)	2,2	0,11
Årsköld et al. (2008)	MRS (50 g/L Sucrose, 37°C, pH 5,5)	1,6*	0,03
El-Ziney et al. (1998)	MRS modifiziert (60 g/L Glucose, 37°C, pH 5,5)	1,22	0,02
Diese Arbeit	MRS modifiziert (49 g/L Glucose, 37°C, pH 5,5)	5,5	0,08

Bereits in der Artbeschreibung von *L. reuteri* (Kandler et al., 1980) wurde auf eine Verbesserung des Zellwachstums unter sauerstofflimitierenden oder anaeroben Bedingungen hingewiesen. Des Weiteren konnte für *K. pneumoniae* durch Sauerstoff eine starke Suppression der 3HPA-Bildung (Ulmer und Zeng, 2007) und darüber hinaus eine deutliche Verringerung der Konzentration des Cobalaminkoenzyms (B₁₂) unter aeroben Bedingungen (Abeles und Lee, 1961) gezeigt werden. In der hier vorliegenden Arbeit wurden anfänglich sauerstofflimitierende Verhältnisse durch eine stehende Kultivierung von *L. reuteri* in einem Gebinde mit geringer Gasphase erreicht, da diese Anzuchtbedingungen den überwiegenden bisherigen Standard darstellen (Vollenweider et al., 2003; Talarico et al., 1988; Slininger et al., 1983). Die stehende Kultivierung hat jedoch zur Folge, dass sich sowohl Sauerstoff-, Substrat- als auch Zellaltergradienten ausbilden und somit eine sehr inhomogene Bakterienkultur entsteht. Durch den Aufbau einer Anaerobisierungsanlage nach Neumann (1993) konnten reproduzierbar anaerobe Medien hergestellt und durch die geschüttelte, anaerobe Inkubation die Ausbildung dieser Gradienten minimiert bzw. verhindert werden. Schließlich verkürzte sich die Wachstumsphase dieser homogenen, aktiven Bakterienkultur bei 37°C von 15 h auf 7-9 h (Abb. 19). Durch dieses sehr schnelle Bakterienwachstum musste bei einer Kultivierung aktiver Biomasse über Nacht die Inkubationstemperatur zur Verlängerung der Wachstumsphase von 37°C auf 33°C gesenkt werden.

Aufgrund der Veränderung der Anzuchtweise und der Medienoptimierung wurde die Enzymaktivität in Abhängigkeit von der Wachstumsphase in einer Batch-Fermentation untersucht. Da die Biotransformationen ohne den Fängerstoff Carbohydrazid durchgeführt wurden, fiel die ermittelte Aktivität durch die toxischen Effekte von 3HPA bei pH 6 deutlich geringer aus. Erwartungsgemäß zeigte sich analog zu Lüthi-Peng et al. (2002a) die höchste Volumenaktivität am Ende der exponentiellen Wachstumsphase (Abb. 20 B). Betrachtet man jedoch die spezifische Aktivität, so zeigte sich, dass bereits in der Mitte der exponentiellen Phase die maximale spezifische Aktivität fast erreicht wurde. Zu diesem Zeitpunkt ist eine Ernte der Biomasse aufgrund der geringen Zelldichte in einem biotechnischen Prozess jedoch nicht rentabel. Daher wurde das Ende der exponentiellen Phase nach 11 h bei maximaler spezifischer und Volumenaktivität als idealer Erntezeitpunkt bestimmt. Im Vergleich zur Fed-Batch-Fermentation (Abb. 23) könnte bei einer früheren Ernte (9-10 h) eine höhere spezifische und/oder Volumenaktivität erreicht werden. Dies wurde aufgrund der Biomasseanzucht im Fed-Batch (Abschnitt 3.5.2) nicht näher untersucht. Des Weiteren fiel während der Absterbephase die spezifische Aktivität im Gegensatz zur geringfügig sinkenden Zelldichte deutlich ab. Dies zeigt die strenge Kopplung der energieintensiven Bildung des B₁₂-Enzyms GDHt an die Wachstumsphase, währenddessen die 3HPA-Bildung bei stabiler GDHt wachstumsentkoppelt ist.

Es stellte sich die Frage, ob bei weiterer Substratverfügbarkeit in einer Fed-Batch-Fermentation die Aktivität der Zellen erhalten werden kann. Nach der erfolgreichen Etablierung der Fed-Batch-Fermentation wurde aufgrund der modifizierten Anzuchtbedingungen die Aktivität erneut bestimmt (Abb. 23). Obwohl die absoluten Werte der Aktivitäten aufgrund der zusätzlichen Verwendung von Carbohydrazid nicht direkt verglichen werden konnten, zeigte sich dennoch ein fast identischen Verlauf im Vergleich zur Batch-Fermentation (Abb. 20). Somit konnte bereits nach 9 h aktive Biomasse geerntet werden. Durch die weitere Zugabe des Glucose- und Fleischextraktfeeds nach dem Erreichen der stationären Wachstumsphase konnte die Aktivität nicht erhalten werden. Diese sank rasch ab und offenbarte erneut die starke Kopplung der GDHt-Biosynthese an das Wachstumsstadium.

Unter den gegebenen technischen Voraussetzungen der Anaerobisierungsanlage (Abb. 12) und der Ergebnisse des Abschnitts 3.1 wurde die optimierte Biomasseanzucht im Batch ausschließlich anaerob und geschüttelt durchgeführt (Abb. 63). Aufgrund des schnelleren Wachstums wurde für Inkubationen über Nacht die Temperatur von 37°C auf 33°C gesenkt. Durch zwei Vorkulturschritte konnte ein eventuelles ungleichmäßiges Anwachsen der Bakterien aufgrund der Lagerung bei -80°C im ersten Vorkulturschritt effektiv kompensiert werden.

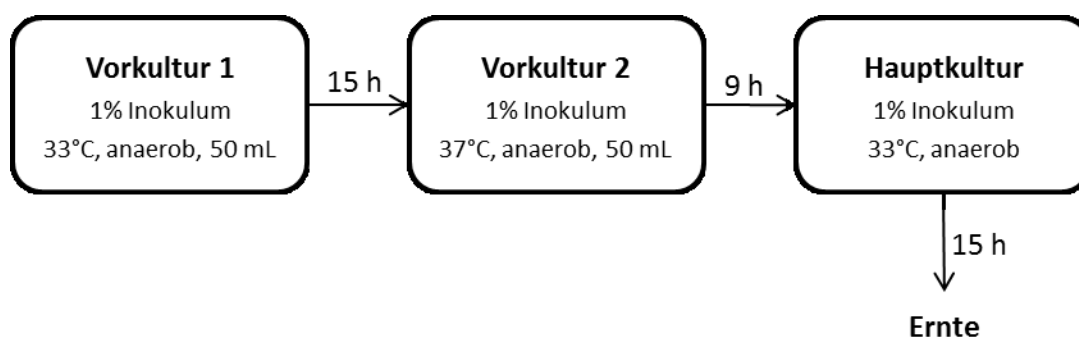


Abb. 63: **Optimierte Biomasseanzucht von *L. reuteri***; anaerobe Bedingungen, Batch-Fermentationen

4.2 Biotransformation mit *L. reuteri* ohne Fängerstoffzugabe

In den ersten Biotransformationsversuchen wurde zunächst auf die Zugabe von Fängerstoffen verzichtet, da die spätere Aufreinigung der 3HPA-Carbazone und die Rückgewinnung von 3HPA kaum untersucht wurde (Ulmer und Zeng, 2007; Vollenweider und Lacroix, 2004). Hierbei zeigte sich jedoch ein vollständiger Stillstand der 3HPA-Bildung in der Biotransformation nach 45-60 min. Zunächst resultierte die Lagerung der Biomasse bei höheren Temperaturen in einem raschen Aktivitätsverlust (Abb. 24). Da die verbliebende Aktivität jedoch nach 10 h bei 35°C über 80 % betrug, ist eine temperaturbedingte Inaktivierung der GDHt bei ausreichend vorhandenem Substrat unwahrscheinlich. Um einen biogenen GDHt-Abbau durch Proteasen auszuschließen, wurde eine örtliche Trennung von Proteasen und GDHt mittels Quervernetzung aller Zellbestandteile durch GDA untersucht, da in mehreren Publikationen durch eine Quervernetzung aller Zellbestandteile mittels GDA eine Stabilisierung der Enzymaktivität über einem längeren Zeitraum erreicht werden konnte (Walt und Agayn, 1994; Hartmeier, 1986). *L. reuteri* zeigte jedoch bei der Applikation von GDA bereits bei einer Konzentration von 10 mM eine vollständige Inaktivierung der GDHt, obwohl die Zellüberlebensrate erst ab 20 mM effektiv beeinflusst wurde (Abb. 25). Bei dieser Konzentration ist allerdings noch keine ausreichende Quervernetzung zu erwarten. Dies verdeutlicht die starke Sensibilität der GDHt gegenüber reaktiven Aldehyden (wie z.B. 3HPA), wobei eine Reaktion des Aldehyds mit den Aminosäuren der GDHt angenommen wird (Schäfer et al.,

2010; Vollenweider et al., 2010). Das Enzym kann dadurch seine Funktion nicht mehr aufrechterhalten, sei es durch Inaktivierung bzw. Blockierung des katalytischen Zentrums, Unterbindung des Elektronentransfers vom Kobaltradikal des B₁₂-Koenzyms oder ähnliches (Toraya, 2000).

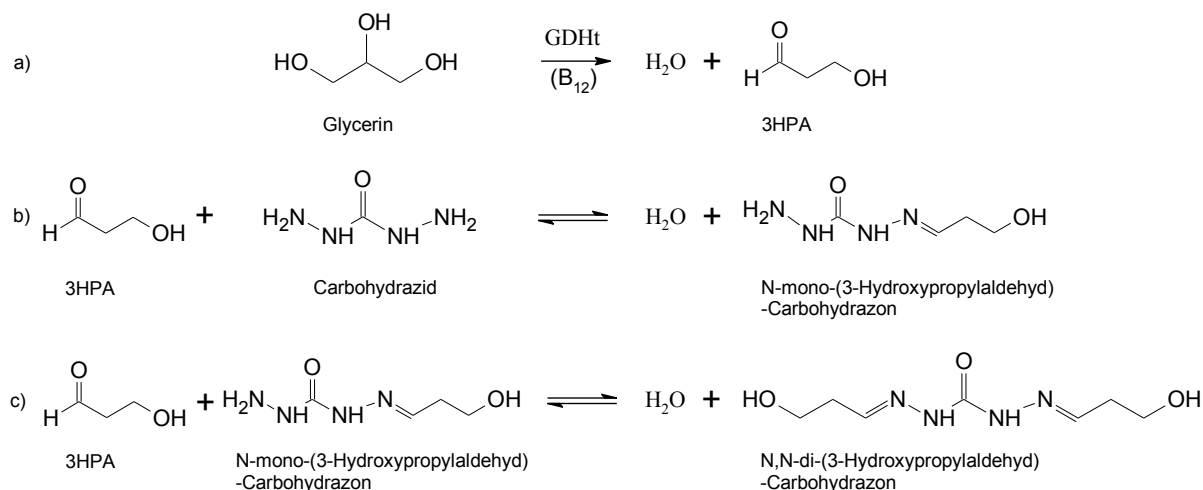
Von mehreren Autoren wurde bereits mit *L. reuteri* die Kofermentation von Glycerin und Glucose unter Wachstumsbedingungen näher beschrieben (Tobajas et al., 2008; El-Ziney et al., 1998; Veiga-Da-Cunha und Foster, 1992; Talarico et al., 1990; Talarico et al., 1988). Es zeigte sich eine Erhöhung der Biomasse und eine Verlagerung der Endprodukte, wobei statt Ethanol Acetat produziert und dadurch zusätzlich Energie (ATP) und 1,3-PDO gewonnen werden konnte. Aufgrund der zeitlichen Trennung des Zellwachstums von der Biotransformation bei der 3HPA-Herstellung wurde die Biotransformation von Glycerin mit Glucose durch Lüthi-Peng et al. (2002b) näher untersucht. Demzufolge werden die aus der Glucose gebildeten Reduktionsäquivalente zur Reduktion von 3HPA zu 1,3-PDO verwendet. In der hier vorliegenden Arbeit wurden nur geringe Mengen Glucose (40 mM) während der Biotransformation zugegeben, um den zelleigenen ATP-Pool und die Mechanismen zur Reaktivierung inaktivierter GDHt zu unterstützen (Abschnitt 3.2.3), da ein analoger Mechanismus zu *K. pneumoniae* vermutet wird (Toraya und Mori, 1999; Mori et al., 1997a; Mori et al., 1997b; Honda et al., 1980). Die Reaktivierung gelang jedoch nicht und neben der typischen Inaktivierung erfolgte analog zur Literatur (Lüthi-Peng et al., 2002b; Talarico et al., 1988) ein Abbau der Glucose zu Acetat und Lactat bzw. die Reduktion von 3HPA zu 1,3-PDO. Als Ursache für die beobachtete Verringerung des Glucoseabbaus nach erneuter Zugabe wird eine Interaktion des toxischen 3HPA mit aktiven Stoffwechselkomponenten (z.B. Enzyme, Koenzyme) vermutet. Während Glucose kontinuierlich abgebaut wurde, konnte keine zusätzliche GDHt-Aktivität beobachtet werden. Somit ist die Glucose-Zugabe während der Biotransformation nicht geeignet, um die 3HPA-Bildung zu erhalten und zudem kontraproduktiv aufgrund der Reduktion von 3HPA zu 1,3-PDO.

Aufgrund der bisherigen Ergebnisse wird das reaktive Aldehyd 3HPA als Ursache des Reaktionsstillstandes gesehen. Durch die Optimierung klassischer Parameter wie pH-Wert, Sauerstoff bzw. Redoxpotential, Lagerungstemperatur, Kosubstratversorgung und zusätzlich einer Quervernetzung (Abschnitt 3.2) können hierbei nur marginale Verbesserungen erreicht werden. Doleyres et al. (2005) konnten durch die Absenkung der Biotransformationstemperatur auf 5-15°C die gebildete 3HPA-Menge erhöhen. Dies ist jedoch nur auf die verringerte Reaktivität des Produktes 3HPA zurückzuführen (Sung et al., 2003; Schauenstein et al., 1977) und keine Lösung für das ursprüngliche Problem der Produkttoxizität und der daraus resultierenden Inaktivierung des Biokatalysators. Des Weiteren haben aktuelle Arbeiten (Vollenweider et al., 2010; Schäfer et al., 2010) die schädliche Reaktion von 3HPA mit Thiol-Gruppen von Aminosäuren bzw. kleinen Molekülen bestätigt. Als mögliche Lösung und somit Hauptziel für eine biotechnische Umsetzung muss nunmehr die in-situ Detoxifizierung von 3HPA angesehen werden, um die anfällige GDHt zu schützen.

4.3 Carbohydrazid und dessen Reaktion mit 3HPA

Bereits Abeles et al. (1960) konnten bei der Umsetzung von Glycerin mit *K. pneumoniae* mithilfe von Semicarbazid als Fängerstoff 3HPA binden, als Zwischenprodukt erkennen und aufreinigen. Neben der Optimierung dieser Fermentation versuchten mehrere Autoren den zugrunde liegenden Reaktionsweg nachzuvollziehen (Ulmer, 2008; Ulmer und Zeng, 2007; Slininger et al., 1990; Vancauwenberge et al., 1990; Talarico et al., 1988; Slininger und Bothast, 1985; Slininger et al., 1983). In der vorliegenden Arbeit wurde erstmalig

Carbohydrazid in einem biotechnischen Prozess als Aldehydfängerstoff für 3HPA eingesetzt, mit Semicarbazid verglichen (Abschnitt 3.4.2) und bereits teilpubliziert (Krauter et al., 2012). Für massenspektrometrische Analysen wurde 3HPA mittels präparativer Chromatographie aufgereinigt (Abschnitt 3.3.2), das eine kostengünstigere, schnellere Alternative zu der Aufreinigungsmethode nach Vollenweider et al. (2003) darstellt. Trotz der geringeren 3HPA-Ausbeute konnte die Reaktion von 3HPA mit Carbohydrazid in der Massenspektrometrie untersucht werden. Erwartungsgemäß zeigten nach Kurzer und Wilkinson (1970) beide Hydrazinogruppen des Carbohydrazids die Bindung von 3HPA (Abb. 29), da sowohl das N-mono- als auch das N,N-di-(3-Hydroxypropylaldehyd)-Carbohydrazon gemessen wurden. Das zugrunde liegende Reaktionsschema ist in Gleichung 2 dargestellt.



Gleichung 2: Reaktionsschema zur (a) enzymatischen Dehydratisierung von Glycerin zu 3HPA und dessen Detoxifizierung durch Carbazonbildung mit Carbohydrazid zum (b) N-mono- und (c) N,N-di-(3-Hydroxypropylaldehyd)-Carbohydrazon

Während Kurzer und Wilkinson (1970) von einer sehr schnellen Dihydrazonbildung berichten, bei der nur unter bestimmten kontrollierten Bedingungen eine messbare Bildung von Monohydrazonen nachweisbar ist, konnte dementsprechend in dieser Arbeit bei der Reaktion von Carbohydrazid mit geringeren Mengen Aldehyd (3HPA) sowohl das N-mono- als auch das N,N-di-(3-Hydroxypropylaldehyd)-Carbohydrazon (Abb. 29 A) gemessen werden. Dies legt die Vermutung nahe, dass die Reaktionen b und c der Gleichung 2 gleichrangig und unabhängig voneinander ablaufen. Ein von Ulmer et al. (2007) beschriebenes Zwischenprodukt konnte massenspektrometrisch in der vorliegenden Arbeit indes nicht beobachtet werden.

Für die Gleichgewichtsreaktion der Hydrazonbildung ist es essentiell, wie bereits von Slininger et al. (1985) beschrieben, dass die freie Form des Hydrazids vorliegt und genügend Hydronium-Ionen vorhanden sind. Um 3HPA effektiv aus dem Reaktionsgleichgewicht zu entfernen, ist diese Bedingung für die Fängerstoffe Carbohydrazid und Semicarbazid nahe ihrem Halbäquivalenzpunkt (pK_s) erfüllt. Die ermittelten Werte mit $pK_s = 9$ für Carbohydrazid und $pK_s = 8,7$ für Semicarbazid (Abb. 27) lassen eine optimale 3HPA-Entfernung aus dem Reaktionsmedium im leicht basischen pH-Bereich vermuten. Aufgrund des ermittelten pH-Optimums der GDHt bei pH 7,2 (Abb. 38 B) muss allerdings ein Kompromiss zwischen Reaktionsgeschwindigkeit und effektiver 3HPA-Entfernung bzw. Biokatalysatorstandzeit gefunden werden.

4.4 Biotransformation mit *L. reuteri* mit Fängerstoffzugabe

Bei der Biotransformation von Glycerin zu 3HPA mit *L. reuteri* in den linsenförmigen PVAL-Hydrogelen (LentiKats®) konnte keine Querreaktion des reaktiven Produktes 3HPA mit den Bestandteilen der LentiKats® festgestellt werden (Abb. 30). Es zeigte sich jedoch ein Verdünnungseffekt der unbeladenen LentiKats® auf die Glycerinkonzentration. Mit 10 % weniger gemessenem Glycerin als eingesetzt, entspricht dies ungefähr der verwendeten Menge an porösen Immobilisaten, das in dem hohen Wassergehalt der LentiKats® (80 %) begründet ist. Durch die Sauerstoffexposition bei der Immobilisatherstellung mussten die immobilisierten Bakterien aufgrund der Sauerstoffempfindlichkeit der GDHt (Details unter Abschnitt 4.6) unter anaeroben Wachstumsbedingungen zusätzlich regeneriert werden. Bei einer absolut anaeroben Herstellung der Immobilisate könnte vermutlich vollständig auf eine Regeneration verzichtet werden. Dies müsste zunächst in entsprechenden Versuchen belegt werden. Als denkbare Alternative zur Reduktion dieser zusätzlichen Inkubation könnte der Einschluss und die Anzucht einer deutlich geringeren Animpfkonzentration von *L. reuteri* in die LentiKats® ähnlich der Sporenbeimpfung bei *Clostridium butyricum* NRRL B-1024 (Wittlich, 2001) dienen. Dabei würden die Bakterien aktiv die Immobilisate bewachsen, wobei dies aufgrund der unsterilen Arbeitsweise während der Immobilisierung verstärkt zu Kontaminationen oder einem ungleichmäßigem Bewachsen führen könnte. Eine sterile Immobilisierung würde dies verhindern, jedoch in einer großtechnischen Umsetzung deutliche Mehrkosten (Energie) verursachen. Aus diesen Gründen wurde von dieser Strategie abgesehen. Da das Zellmaterial durch die Immobilisierung unkompliziert und schnell von dem Biotransformationsmedium abgetrennt werden konnte, wurden zusätzliche Schäden an der Biomasse durch z.B. Scherkräfte aufgrund von Rührwerken, Zentrifugation oder Resuspension vermieden werden. Deshalb wurde für die nachfolgenden Versuche zur Biokatalysatorstandzeit und der 3HPA-Produktion in LentiKats® die Prozessführung einer Repeated-Batch-Biotransformation gewählt.

Nach der Identifizierung des Produktes 3HPA als Hauptursache für den Aktivitätsverlust in der Biotransformation (Abschnitt 4.2) wurde der Ansatz der Fängerstoffe wieder aufgegriffen. Während der Fängerstoff Semicarbazid bereits für *K. pneumoniae* mehrfach erfolgreich angewendet wurde (Vancauwenberge et al., 1990; Slininger und Bothast, 1985; Slininger et al., 1983), zeigten Talarico et al. (1988) für *L. reuteri* eine vollständige Inhibierung der 3HPA-Bildung, da in der verwendeten HPLC-Analytik nach der Zugabe von Semicarbazid kein Reuterin mehr nachgewiesen werden konnte. Dementgegen wurde in der hier vorliegenden Arbeit das entstandene 3HPA-Semicarbazon bzw. 3HPA-Carbazon sowohl im colorimetrischen Test (Abb. 61) als auch in der verwendeten HPLC-Analytik nachgewiesen und eine deutliche Erhöhung der 3HPA-Produktion gemessen werden. Dies widerlegt die Aussage von Talarico et al. (1988). Durch die äquimolare Verwendung von Semicarbazid konnte die Standzeit des Biokatalysators im Gegensatz zur Biotransformation ohne Fängerstoff auf mindestens 7 Zyklen erhöht werden, zeigte aber dennoch deutliche Aktivitätsverluste (Abb. 31). In weiteren Versuchen wurde der Fängerstoff Carbohydrazid verwendet. Aufgrund der beiden reaktiven Hydrazinogruppen (Abschnitt 4.3) konnte bereits mit dem Einsatz in der halben Glycerinkonzentration eine sehr gute Detoxifikation des Produktes 3HPA erzielt und der Biokatalysator erstmalig in 10 Zyklen wiederverwendet werden. Durch die Verwendung einer äquimolaren Konzentration zu Glycerin konnte das produzierte 3HPA nochmals deutlich auf 67 g erhöht und ein durchschnittlicher Umsatz von 90 % erzielt werden (Abb. 31). Die hier gezeigten Ergebnisse wurden im Rahmen dieser Arbeit bereits patentiert (Haas et al., 2010) und publiziert (Krauter et al., 2012). Der auftretende restliche Aktivitätsverlust wurde unter anderem der Sauerstoffexposition beim Pufferwechsel, einer

natürlichen mechanismusbasierten Inaktivierung des entstehenden Kobaltradikals (Toraya, 2003; Toraya, 2000) und einer geringen Zellauswaschung aus den Immobilisaten zugeschrieben. Die natürliche Inaktivierung des B₁₂-Koenzyms war bei dem verwendeten Versuchsaufbau irreversibel, da der Zelle keine Energie zur Regenerierung zur Verfügung stand. Eine Regeneration mit Glucose nach einer bestimmten Anzahl an Batches könnte dem entgegenwirken, wurde jedoch nicht näher untersucht.

Im Vergleich zu einer Batch-Biotransformation (Vancauwenberge et al., 1990) und einer Fed-Batch-Biotransformation (Ulmer und Zeng, 2007) jeweils mit dem Fängerstoff Semicarbazid und suspendierten *K. pneumoniae* Zellen konnte mit *L. reuteri* in LentiKats® und dem Fängerstoff Carbohydrazid in einer Repeated-Batch-Biotransformation eine deutlich größere 3HPA-Menge ohne zusätzliche Zugabe frischer Biomasse produziert werden (Abb. 64). Die Literaturdaten wurden hierfür auf die Volumina des in Abschnitt 3.4.2 verwendeten Versuchsaufbaus angepasst.

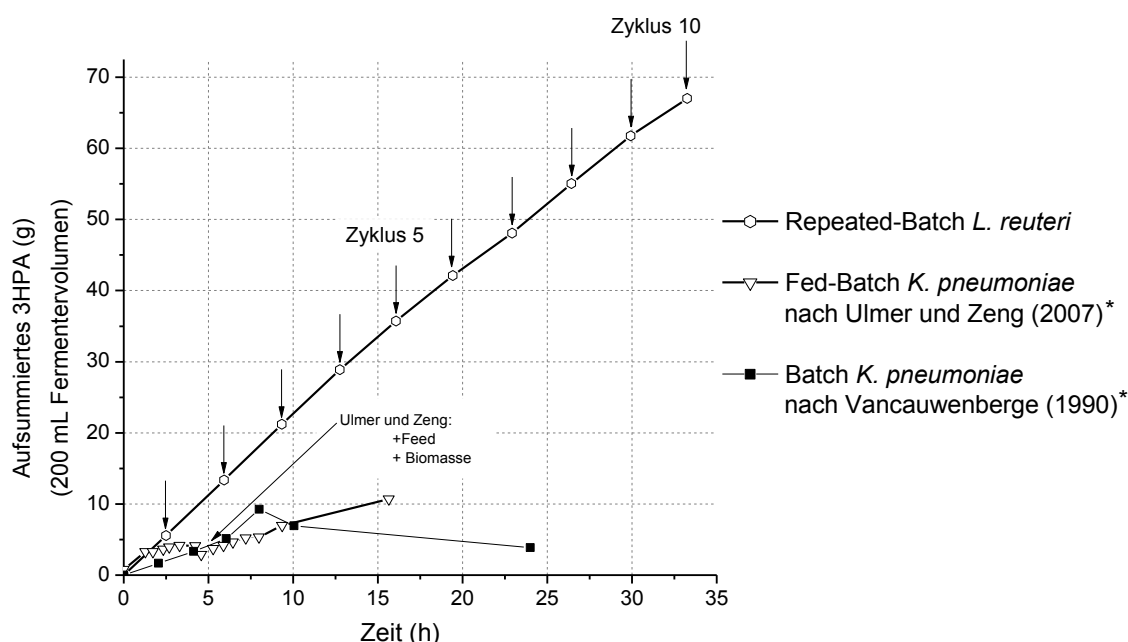


Abb. 64: **Vergleich der 3HPA-Bildung in einer Repeated-Batch-Biotransformation mit *L. reuteri*-LentiKats®-Immobilisaten und 520 mM Carbohydrazid zur Literatur;** aufsummierte, produzierte 3HPA-Menge mit 10 % (w/v) LentiKats®, Wiederverwendung der Biomasse in jedem Zyklus (200 mL, 500 mM Glycerin, pH 7, 35°C, anaerob), Fed-Batch-Fermentation nach Ulmer und Zeng, 2007 (14 g BTM/L Gesamtbiomasse *K. pneumoniae*, 825 mM Semicarbazid, 956 mM Glycerin, pH 6, 30°C, limitierte Sauerstoffverfügbarkeit), Batch-Fermentation nach Vancauwenberge et al., 1990 (14,5 g BTM/L *K. pneumoniae* NRRL B-4011, 359 mM Semicarbazid, 760 mM Glycerin, pH 6, 28°C), (*) Literaturdaten an den verwendeten Versuchsaufbau angepasst

Diese Ergebnisse belegen, dass 3HPA die Hauptursache der Inaktivierung der GDHt darstellt. Mit der Detoxifizierung von 3HPA durch die verschiedenen Fängerstoffe (Abb. 31) wurde für Carbohydrazid bei pH 7 mit *L. reuteri*-LentiKats®-Immobilisaten eine maximale Steigerung der 3HPA-Produktion auf das 67fache und eine 33fache Standzeitverlängerung erreicht. Zudem wurden bei einer Batch-Biotransformation mit suspendierten Zellen (Abschnitt 0) 2 M (150 g/L) 3HPA als Carbazon produziert, das einer Steigerung der 3HPA-Konzentration bei pH 7 um das 17fache und einer 16fachen Standzeitverlängerung entspricht. Durch die Verbesserung der Standzeit bei steigender Fängerstoffkonzentration (Abb. 31) ist ein direkter Zusammenhang zur eingesetzten Glycerinkonzentration erkennbar. Um eine effektive Detoxifizierung zum Schutz des Biokatalysators zu erreichen, müssen die reaktiven Gruppen des Fängerstoffs mindestens in äquivalenter Konzentration im Vergleich zum

Substrat Glycerin vorliegen. Aufgrund des reversiblen Reaktionsgleichgewichtes zwischen Fängerstoff und 3HPA wird zusätzlich ein signifikanter Überschuss an Fängerstoff favorisiert. Dies sollte das Reaktionsgleichgewicht auf die Seite des nicht toxischen 3HPA-Carbazon verschieben (Gleichung 2 b, c). Tatsächlich konnten optimale Ergebnisse (Abschnitt 3.5.3) unter einem äquivalenten bis äquimolaren Einsatz von Carbohydrazid gegenüber Glycerin gemessen werden (Abb. 36). Die Versuche zeigten auch die effizientere Bindung von 3HPA durch Carbohydrazid als durch Semicarbazid, wodurch eine bessere Detoxifizierung erfolgt (Abb. 31).

Aufgrund der vorliegenden Ergebnisse kann nun die mikrobielle 3HPA-Herstellung aus Glycerin mit dem geschichtlichen Hintergrund differenzierter betrachtet werden. Die Bildung von Acrolein aus Glycerin durch verschiedene Bakterien ist bereits sehr früh publiziert worden (Mills et al., 1954; Serjak et al., 1954). Erst durch Abeles et al. (1960) konnte mittels Semicarbazid 3HPA als Zwischenprodukt isoliert und analysiert werden. Dabei zeigte sich, dass Acrolein ein säurekatalysiertes Nebenprodukt von 3HPA darstellt (Sobolov und Smiley, 1960). Das zentrale Enzym, die GDHt, wurde unter anderem sowohl aus *K. pneumoniae* und *Citrobacter freundii* als auch aus Lactobacillen isoliert und charakterisiert (Talarico und Dobrogosz, 1990; Forage und Foster, 1979; Johnson et al., 1975; Stroinski et al., 1974; Schneider et al., 1970; Smiley und Sobolov, 1962). Aufgrund folgender zwei entscheidender Publikationen wurde *L. reuteri* aus dem Fokus der Forschung gedrängt. Dies geschah aus jetziger Sicht jedoch zu Unrecht.

Slininger et al. (1983) bezeichneten die isolierte sauerstoffempfindliche GDHt von *Lactobacillus sp.* NRRL B-1720 (208A) als ungenügend, da hier ohne Einsatz eines Fängerstoffs nach der typischen Reaktionszeit von 60 min die Aktivität irreversibel erlosch. Dabei wurde das isolierte Enzym aus *Lactobacillus sp.* mit Ganzzellkatalysatoren von *K. pneumoniae* verglichen, die mit dem Fängerstoff Semicarbazid bis zu 55 % des theoretischen Wertes Glycerin in 3HPA umsetzten. Diese Reaktionsverbesserung beruhte jedoch auf der Verwendung von Bakterien, die Glycerin als einzige C-Quelle nutzen können. Aufgrund ihres intakten Stoffwechsels (ATP-Verfügbarkeit) sind diese in der Lage, die inaktivierte GDHt effektiv zu regenerieren und somit vermehrte Mengen 3HPA zu bilden. In einer weiteren Publikation (Talarico et al., 1988) wurde bei *L. reuteri* durch die Zugabe des Fängerstoffs Semicarbazid eine Eliminierung der Reuterinproduktion beschrieben. Aufgrund der Ergebnisse aus Abschnitt 3.4.2 konnte nun gegensätzlich die Verbesserung der 3HPA-Produktion mit Semicarbazid gezeigt werden.

Im Hinblick auf die Produktion einer Plattformchemikalie wurde durch die scheinbar besten Ergebnisse mit *K. pneumoniae* die 3HPA-Herstellung mit diesem Bakterium und Semicarbazid optimiert (Slininger und Bothast, 1985) und patentiert (Slininger et al., 1990). Erst mit der Verwendung von reinem 3HPA für klinische bzw. pharmazeutische Anwendungen rückte *L. reuteri* wieder in den Fokus wissenschaftlicher Untersuchungen, obgleich immer ohne Fängerstoffeinsatz (Cleusix et al., 2008; Cleusix et al., 2007; Doleyres et al., 2005; Sung et al., 2003; El-Ziney et al., 1999).

Betrachtet man die Physiologie der verwendeten Zellen genauer, wird zwischen *L. reuteri* und *K. pneumoniae* ein erheblicher Unterschied erkennbar. *K. pneumoniae* kann auf Glycerin als einziger Kohlenstoffquelle wachsen (Abeles et al., 1960), während *L. reuteri* lediglich in der Lage ist, Glycerin auf reduktivem Weg zu 3HPA zu dehydratisieren bzw. mittels Reduktionsäquivalenten zu 1,3-PDO zu reduzieren (Daniel et al., 1998; Talarico et al., 1988). Sobald die Reduktionsäquivalente erschöpft sind, kommt es zu der typischen 3HPA-Akkumulation, die letztendlich zum Zelltod bzw. der Inaktivierung der Enzymaktivität führt (Vollenweider

et al., 2010; Schäfer et al., 2010). Bei *K. pneumoniae* tritt frei messbares 3HPA nur während sehr hohen Syntheseleistungen (z.B. 1,3-PDO-Fermentation) als unerwünschtes Nebenprodukt auf (Barbirato et al., 1998; Barbirato et al., 1996). Dieser im ersten Augenblick erscheinende Nachteil von *L. reuteri* erweist sich hier nun von größter Bedeutung.

Fallstudie *K. pneumoniae*:

Durch seinen intakten Stoffwechsel bei der Verwertung von Glycerin ist *K. pneumoniae* in der Lage, 3HPA permanent mittels Reduktionsäquivalenten zu 1,3-PDO zu reduzieren. Dies macht den Einsatz eines Fängerstoffs als Reduktionsschutz unabdingbar. Der Einsatz als Biomassenschutz wurde bisher nicht erkannt, da aufgrund der eigenen Energieversorgung (ATP) die inaktivierte GDHt durch den zelleigenen reaktivierenden Faktor regeneriert werden kann. Aus diesem Grund können höhere 3HPA-Konzentrationen als mit *L. reuteri* ohne Fängerstoff erzielt werden, allerdings nur bis zu einer auch für *K. pneumoniae* toxischer Konzentration von ungebundenem 3HPA.

Laut Ulmer und Zeng (2007) wurde in einer Fed-Batch-Fermentation die bisher höchste Ausbeute von 97 % bei einem Gesamt-Glycerinumsatz von 79 % und einer 3HPA-Endkonzentration von 729 mM unter Zugabe zusätzlicher aktiver Biomasse erreicht. Die Aussage der Autoren, dass die Zugabe von Semicarbazid toxisch ist, trifft dabei nur teilweise zu. Für die Anzucht der Biomasse ist jeglicher Fängerstoff wie z.B. Semicarbazid oder Carbohydrazid (DNPH, Natriumhydrogensulfit usw.) aufgrund der unspezifischen Bindung der Aldehyde und Ketone (Meier und Ullrich, 1995) für jedes Bakterium toxisch. Hierbei werden essentielle, zentrale Schlüsselverbindungen wie z.B. Dihydroxyaceton, Glycerinaldehyd-3-phosphat, Acetaldehyd und Phosphoenolpyruvat (Abb. 5) dem Stoffwechsel entzogen, dieser dadurch zum Erliegen gebracht und infolgedessen die ATP-Bildung und der Reduktionsäquivalentepool (NAD^+/NADH) bzw. dessen Regenerierung immens gestört. Dies belegt auch die Beobachtung, dass bei zu hohen Semicarbazidkonzentrationen keine Nebenproduktbildung mehr erfolgte (Ulmer und Zeng, 2007). Des Weiteren findet sich in der Literatur bezüglich der Semicarbazidverwendung mit dem Biokatalysator *K. pneumoniae* in einer klassischen Fermentation immer eine geringere Semicarbazidkonzentration im Vergleich zum eingesetzten Glycerin als optimal für das Wachstum, da hierbei der Stoffwechsel intakt bleibt (Tab. 15). Das in der vorliegenden Arbeit ermittelte, minimale äquivalente Konzentrationsverhältnis zwischen Fängerstoff und eingesetztem Glycerin wurde jedoch in keinem Fall eingehalten (Tab. 15).

Um die Biomasse während der Biotransformation von Glycerin zu 3HPA zu schützen, ist die Zugabe von Semicarbazid nicht toxisch, sondern substanziell. Diese Aussage kann aufgrund der gezeigten Ergebnisse der vorliegenden Arbeit mit *L. reuteri* und Carbohydrazid (Abschnitt 3.4.2) auf *K. pneumoniae* und Semicarbazid übertragen werden. Weiterhin wird dies durch die deutlich verbesserte 3HPA-Produktion bei der fast äquimolaren Verwendung von Fängerstoff und Glycerin in Ulmer et al. (2007) untermauert. Jedoch wurde der Zusammenhang zwischen Glycerin und Fängerstoff in dieser Arbeit nicht erkannt und eine toxische Wirkung von Semicarbazid gemutmaßt. Die Schlussfolgerung einer Fütterungsstrategie für Semicarbazid ist aufgrund der ineffektiven Detoxifizierung kontraproduktiv und dadurch die Zugabe aktiver Biomasse notwendig.

Tab. 15: **Biotransformation von Glycerin zu 3HPA mit *K. pneumoniae* und Fängerstoffeinsatz**; Vergleich der Konzentrationen von Glycerin und Semicarbazid

Organismus	Semi-carbazid (mM)	Glycerin (mM)	3HPA (mM)	Verhältnis Glycerin/Semicarbazid	Umsatz (%)	Autor
<i>K. pneumoniae</i> ATCC8724	161	542	188	3,37	35	Slininger und Bothast (1985)
<i>K. pneumoniae</i> ATCC8724	359	760	621	2,12	82	Vancauwenberge et al. (1990)
<i>K. pneumoniae</i> ATCC8724	240	326	177	1,36	54	Slininger et al. (1983)
<i>K. pneumoniae</i> DSM2026	825	956	756	1,16	79	Ulmer und Zeng (2007)

Fallstudie *L. reuteri*:

Da *L. reuteri* mit Glycerin als alleinige Kohlenstoffquelle nicht wachsen kann, erfolgt die Biomasseproduktion getrennt von der Biotransformation mit einem geeigneten Wachstumssubstrat (z.B. Glucose). Diese Entkopplung hat den Vorteil, dass minimal gepuffertes Wasser als Biotransformationsmedium ausreichend und eine Aufreinigung des Produktes im Gegensatz zu einem Komplexmedium vereinfacht ist (Doleyres et al., 2005; Lüthi-Peng et al., 2002a; Lüthi-Peng et al., 2002b). Neben 3HPA entstehen durch Dismutation nur noch geringe Mengen 3HP und 1,3-PDO (weitere Details in Abschnitt 3.7.1). Ein Reduktionsschutz des produzierten 3HPA, wie bei *Klebsiella pneumoniae*, ist nicht notwendig. Demgegenüber ist jedoch die Verwendung von Fängerstoffen essentiell für den Schutz des Biokatalysators bzw. der GDHt, da ohne ATP-Verfügbarkeit diese nicht regeneriert werden kann. Hierbei muss der Fängerstoff gegenüber dem eingesetzten Glycerin mindestens in äquivalenter Menge zugegeben werden, um freies 3HPA effektiv zu binden und um die Enzymaktivität zu erhalten (Krauter et al., 2012; Haas et al., 2010).

Während Smiley und Sobolov (1962) eine starke Inhibition der 3HPA-Produktion durch thiolgruppenangreifende Reagenzien (Phenylmercuriacetat, p-Chloromercuribenzoat) zeigten, konnten in aktuellen Arbeiten (Schäfer et al., 2010; Vollenweider et al., 2010) Thiolgruppen z.B. in Cystein oder Glutathion als Hauptziel der 3HPA-Interaktion identifiziert werden. In Versuchen mit aufgereinigtem Enzym sind diese Stoffe nicht ausreichend vorhanden und es kommt somit zur direkten Interaktion von 3HPA mit Thiolgruppen der GDHt und folglich zur Inaktivierung. Aufgrund dessen und der in dieser Arbeit mit Fängerstoffen erzielten Ergebnisse wird entgegen den Literaturangaben (Kajiura et al., 2007; Kajiura et al., 2001; Seifert et al., 2001; Tobimatsu et al., 2000; Toraya, 2000; Daniel et al., 1998; Honda et al., 1980) nicht Glycerin als die Hauptursache der GDHt-Inaktivierung angesehen, sondern die toxische Wirkung schon geringer Mengen an 3HPA.

4.5 Optimierung der Biotransformation mit suspendierten Zellen

In Vorversuchen zeigte sich sowohl für Glycerin (Abb. 35 A) als auch für Carbohydrazid (Abb. 35 B) eine klassische Substratüberschusshemmung. Um diese zu verhindern, könnte eine Fed-Batch-Strategie verfolgt werden, in der beide Substanzen kontinuierlich zugegeben werden. Im Rahmen der Fed-Batch-Biotransformation zur Untersuchung der Temperaturstabilität (Abb. 40, 1,5 M Glycerin und 1,5 M Carbohydrazid) wurde dies im Vergleich zum Batchansatz (Abb. 36, 1,5 M Carbohydrazid, 1,7 M Glycerin) bestätigt. Die Produktivität konnte hierbei von $11,3 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ im Batch auf $21,6 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ im Fed-Batch gesteigert werden.

Wie aus Abschnitt 4.4 ersichtlich, stehen die Konzentrationen des Substrates Glycerin und des Fängerstoffs Carbohydrazid aufgrund des toxischen Produktes 3HPA im direkten Zusammenhang und wurden zusammen in Batch-Biotransformationen untersucht (Abschnitt 3.5.3). Für die Optimierung des Biomasseschutzes erfolgte eine Unterteilung der Konzentrationsverhältnisse in drei theoretisch mögliche Bereiche. So wurde der Fängerstoff Carbohydrazid im Vergleich zum eingesetzten Glycerin mit weniger als der äquivalenten Menge (Bereich 1), in einer Konzentration zwischen äquivalent und äquimolar (Bereich 2) sowie mehr als äquimolar (Bereich 3) eingesetzt (Abb. 65).

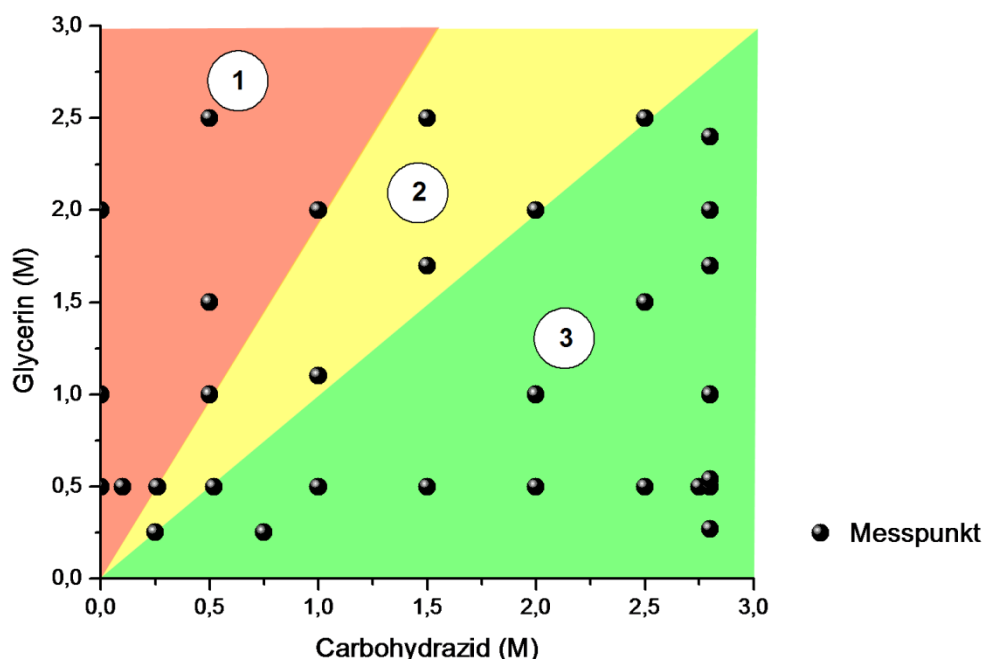


Abb. 65: **Unterteilung der Glycerin- und Carbohydrazidkonzentrationsverhältnisse bezüglich des erwarteten Biomasseschutzes;** ①-rot Carbohydrazid im äquivalentem Überschuss, ②-gelb Carbohydrazidkonzentration zwischen äquivalent und äquimolar, ③-grün Carbohydrazid mehr als doppelter Überschuss zur eingesetztem Glycerinkonzentration (50 mL, 10^{10} Zellen/mL *L. reuteri*, 35°C, pH 7, 500 rpm, anaerob)

Aufgrund der gewonnenen Erkenntnisse aus Abschnitt 4.4 werden die optimalen Ergebnisse im Bereich 3 vermutet, da hier der größtmögliche Schutz der Biomasse vorliegt. Wie erwartet, konnten in diesem Bereich die Maxima der spez. Aktivität, der 3HPA-Endkonzentration und der Produktivität gefunden werden (Abb. 36), das die Hypothese zum Biomasseschutz bestätigt. Es ist zu beobachten, dass je nach gewünschter Zielstellung die Optima verschieden sind. Eine der höchsten 3HPA-Endkonzentrationen wurde bei einem äquimolaren Verhältnis von jeweils 2 M Glycerin und Carbohydrazid ermittelt, während die höchste Aktivität bei 0,5 M Glycerin und 0,52 M Carbohydrazid

verzeichnet wurde. Da es sich bei den Optimierungsversuchen im Gegensatz zu Abschnitt 3.4.2 mit LentiKats® (Abb. 64) um Batch-Biotransformationen mit suspendierten Zellen handelte, können diese direkt ohne Datenanpassung mit Literaturangaben verglichen werden (Abb. 66). Durch den Einsatz von Carbohydrazid in mindestens äquimolarem bzw. 2fach valentem Verhältnis zu Glycerin unter anaeroben Bedingungen konnte die Biokatalysatorstandzeit effektiv verlängert und bei erhöhter Temperatur ein Vielfaches an 3HPA als Carbazon mit einer höheren Produktivität hergestellt werden.

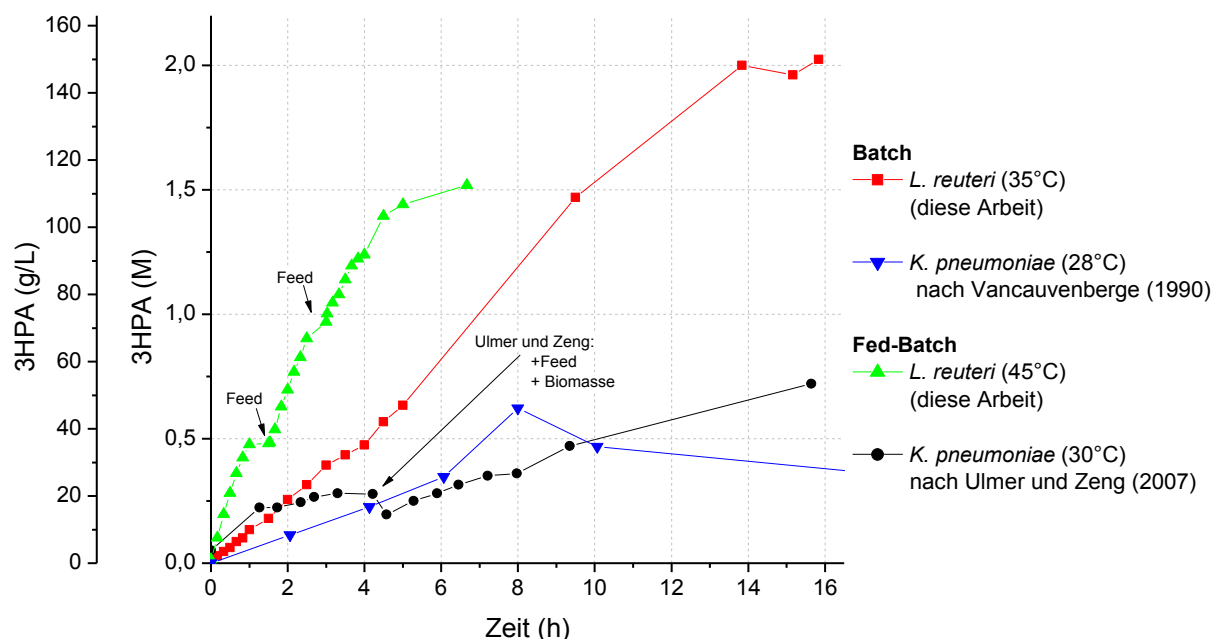


Abb. 66: **3HPA-Produktion bei verschiedenen Fütterungsstrategien im Vergleich zur Literatur**; Batch *L. reuteri* (2 M Carbohydrazid, 2 M Glycerin, 7 g BTM/L, pH 7, 35°C, anaerob), Fed-Batch *L. reuteri* (1 M Carbohydrazid, 1,5 M Glycerin, 7 g BTM/L, pH 7, 45°C, anaerob), Batch *K. pneumoniae* nach Ulmer und Zeng, 2007 (825 mM Semicarbazid, 956 mM Glycerin, 14 g BTM/L, pH 6, 30°C, limitierte Sauerstoffverfügbarkeit), Batch *K. pneumoniae* NRRL B-4011 nach Vancauwenberge et al. 1990 (359 mM Semicarbazid, 760 mM Glycerin, 14,5 g BTM/L, pH 6, 28°C)

In anfänglichen Biotransformationsversuchen zeigte sich eine Verschiebung des optimalen pH-Wertes aus dem sauren Bereich (pH 5) ohne Fängerstoffverwendung in den neutralen Bereich (pH 7) mit Fängerstoffzugabe (Abb. 32). Da Aldehyde im sauren Milieu eine geringere Reaktivität zeigen (Okuda et al., 1991; Hopwood et al., 1970), befindet sich das scheinbare pH-Optimum aufgrund der reduzierten 3HPA-Toxizität und folglich reduzierter GDHt-Inaktivierung im sauren Milieu. Der tatsächliche, optimale pH-Wert der GDHt bleibt jedoch verborgen und kann erst durch den Einsatz des Fängerstoffs Carbohydrazid im Überschuss und die damit verbundene 3HPA-Entgiftung ermittelt werden. Hierbei muss angemerkt werden, dass sich zusätzlich auch die Bildung der 3HPA-Carbazonen in einem Gleichgewicht befindet. Der optimale pH-Wert der 3HPA-Carbazonbildung wird sich aufgrund des pK_B -Wertes wahrscheinlich im leicht basischen Bereich befinden (Abb. 27). Aus diesem Grund kann nicht ausgeschlossen werden, dass diese Reaktion wiederum das wahre pH-Optimum der GDHt geringfügig verschleiert.

Bei der pH-Wert-Optimierung mit suspendierten Zellen und dem Fängerstoff Carbohydrazid wurde bei 35°C ein pH-Optimum von 7,2 ermittelt (Abb. 38), das mit Talarico und Dobrogosz (1990) übereinstimmt. Hierbei ist zu erwähnen, dass in deren Arbeit das Optimum mithilfe von 1,2-PDO bestimmt wurde, wobei das weitaus weniger toxische Propanal entsteht.

Dementgegen wurde in der ersten Publikation zur GDHt aus *Lactobacillus* 208-A (Smiley und Sobolov, 1962) ein pH-Optimum von 5,8 und durch Lüthi-Peng et al. (2002a) ein anfänglicher pH-Wert von 4 als optimal beschrieben. In diesen Arbeiten wurde das eigentliche Substrat Glycerin und keinerlei Fängerstoff verwendet. Aus diesem Grund wird hierbei eine Enzym-inaktivierung durch das entstandene, reaktive 3HPA vermutet. Aufgrund der zuvor beschriebenen reduzierten Reaktivität von Aldehyden im sauren Milieu ist durch die Autoren das scheinbare Optimum ermittelt worden. Für *K. pneumoniae* wurde das pH-Optimum in einer Vielzahl von Literaturbelegen zwischen pH 8 und pH 9 bestimmt (Qi et al., 2009; Wang et al., 2007; Johnson et al., 1975; Schneider und Pawelkiewicz, 1966).

Für das Temperaturoptimum der GDHt wurde für *L. reuteri* (Lüthi-Peng et al., 2002a; Chung et al., 1989), *Citrobacter freundii* (Seifert et al., 2001) und *K. pneumoniae* (Wang et al., 2007) ein Wert von 37°C publiziert. Neuere Belege zeigen für *Citrobacter freundii* und *K. pneumoniae* ein Temperaturoptimum von 45°C (Qi et al., 2009; Qi et al., 2006), das durch Mutagenese auf 47°C erhöht werden konnte (Qi et al., 2009). Im Rahmen der hier vorliegenden Arbeit mit Carbohydrazidzugabe wurde für *L. reuteri* das Temperaturoptimum ähnlich zu *K. pneumoniae* und *Citrobacter freundii* bei 45°C (26,7 µkat/g BTM) bestimmt (Abb. 38, Abb. 39). Dieses befindet sich außerdem nahe der von Tobajas et al. (2007) für *L. reuteri* ermittelten idealen Biomasseanzuchttemperatur von 40°C. Durch eine Erhöhung der Biotransformationstemperatur kann die 3HPA-Bildung sowie die Reaktivität des Fängerstoffs Carbohydrazid gesteigert und die maximale Konzentration an gelöstem Sauerstoff verringert werden. Jedoch wird auch die toxische Wirkung von ungebundenem 3HPA bei steigender Temperatur verstärkt, sodass eine effektive 3HPA-Detoxifizierung unabdingbar ist.

Die Reaktionsdauer der Biotransformationen zur Temperaturoptimierung betrug 1 h. Um auf die Langzeitstabilität der GDHt zu schließen, wurde eine Fed-Batch-Biotransformation von 5 h durchgeführt (Abb. 40). Dabei zeigte sich die Reaktion sehr stabil mit einem nur sehr geringen, nicht eindeutig zuordenbaren Aktivitätsverlust, wohingegen der unterschiedliche Laugeverbrauch bzw. die Verringerung der Säureproduktion auf eine Hemmung der Nebenproduktbildung schließen lässt (Abschnitt 4.7). Mittels dieser Fed-Batch-Biotransformation zur Untersuchung der Temperaturstabilität konnte erneut eine Verbesserung der 3HPA-Herstellung im Vergleich zu einer Batch-Biotransformation demonstriert werden. Dabei konnten 1457 mM 3HPA (108 g/L) in 5 h mit einer Produktivität von $21,6 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ hergestellt werden (Abb. 66). Dies entspricht einer 5fachen Standzeitverlängerung und einer 12fach besseren 3HPA-Produktion. Dies ist die bisher höchste publizierte Produktivität bei der Herstellung von 3HPA (Krauter et al., 2012).

4.6 Sauerstoffeinfluss auf die Biotransformation

Bereits in der Literatur wird Sauerstoff als Inhibitor für das Wachstum von *L. reuteri* beschrieben (Kandler et al., 1980). In der vorliegenden Arbeit konnte dies bestätigt und gezeigt werden, dass eine stehende sauerstofflimitierte Zellanzucht zur Herstellung GDHt-aktiver Biomasse ungenügend ist (Abschnitt 3.1.2). Durch die Trennung der Zellanzucht von der Biotransformation stellte sich die Frage, ob auch die Biotransformation anaerobe Bedingungen benötigt oder die Reaktion der GDHt Sauerstoff toleriert. Für die isolierte GDHt von *Lactobacillus* 208-A konnte durch die Zugabe des Reduktionsmittels Natriumdithionit ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$) eine 2,5fache Verbesserung der GDHt-Aktivität gezeigt werden (Smiley und Sobolov, 1962), wobei es weder essentiell für die Reaktion ist, noch die GDHt reaktivieren kann. Während für die isolierte GDHt von *K. pneumoniae* eine Inaktivierung durch Sauerstoff festgestellt wurde (Poznanskaya et al., 1977; Johnson et al., 1975;

Stroinski et al., 1974), konnten Xu et al. (2009) sogar eine stärkere Inaktivierung als durch Glycerin bzw. 3HPA belegen. Für die Dioldehydratase, ein sehr ähnliches Enzym, wurde bereits 1966 (Wagner et al.) die Oxidierung des zentralen Cobaltatoms zu einem enzymatisch inaktiven Hydroxocobalamins beschrieben. Dennoch weisen die Literaturbelege bei der angewendeten Trennung von Zellanzucht und Biotransformation nicht eindeutig auf anaerobe Bedingungen hin oder Sauerstoff wurde als nicht relevant eingestuft (Tab. 16).

Tab. 16: Literaturvergleich bezüglich Sauerstoffeinfluss bei getrennter Zellanzucht und Biotransformation

Organismus	Zellanzucht	Biotransformation	Autor
<i>Lactobacillus spez.</i>	anaerob	anaerob	Sobolov und Smiley (1960)
<i>L. reuteri</i> und <i>K. pneumoniae</i>	<i>L. reuteri</i> - stehend <i>K. pneumoniae</i> - aerob	<i>L. reuteri</i> keine Angaben (isoliertes Enzym) <i>K. pneumoniae</i> aerob (suspendierte Zellen)	Slininger et al. (1983)
<i>K. pneumoniae</i> ATCC8724	aerob	aerob	Slininger und Bothast (1985)
<i>L. reuteri</i>	stehend	anaerob	Talarico et al. (1988)
<i>K. pneumoniae</i> ATCC8724	keine Angaben	keine Angaben	Vancauwenberge et al. (1990)
<i>L. reuteri</i>	anaerob	stehend	Lüthi-Peng et al. (2002a; 2002b)
<i>L. reuteri</i> (ATCC53608) SD2112	stehend	keine Angaben	Vollenweider et al.(2003)
<i>L. reuteri</i>	anaerob	kein signifikanter Unterschied aerober und anaerober Bedingungen	Doleyres et al. (2005)
<i>L. reuteri</i> PRO 137	anaerob	anaerob	Tobajas et al. (2007)
<i>K. pneumoniae</i> DSM2026	sauerstofflimitiert	sauerstofflimitiert	Ulmer und Zeng (2007)
<i>L. reuteri</i> SD2112	anaerob	sauerstofflimitiert	Rütli et al. (2011; 2007)

In anfänglichen Immobilisierungsversuchen zeigte sich bei der Herstellung der LentiKats[®], dass die Sauerstoff-Exposition der Immobilisate während der Stabilisierung einen signifikant hemmenden Einfluss auf die Aktivität in der anschließenden Biotransformation hatte (Abb. 41). Durch die Verkürzung der Stabilisierungszeit konnte jedoch nur eine geringe Verbesserung der Aktivität erzielt werden, wohingegen eine anschließende, anaerobe Regenerierung in MRS-Medium eine deutliche Erhöhung der 3HPA-Produktion zeigte (Abschnitt 3.6.1). Während dieser Regenerierung kann die Bakterienzelle unter Wachstumsbedingungen das B₁₂-Koenzym de novo synthetisieren und die zelleigenen Reparaturmechanismen zum Austausch einsetzen, um die ursprüngliche Aktivität wieder herzustellen. Dabei wird der gleiche Mechanismus wie bei *K. pneumoniae* zugrunde gelegt (Toraya und Mori, 1999; Mori et al., 1997a; Mori et al., 1997b; Honda et al., 1980). Um eventuell auf eine anschließende Regenerierung der Biomasse verzichten zu können, sollte somit idealerweise der komplette Herstellungsprozess der Immobilisate unter strikt anaeroben Bedingungen stattfinden.

Bei der Verwendung von Carbohydrazid in der Biotransformation mit *L. reuteri* in LentiKats® konnte durch die minimierte Toxizität von 3HPA alleinig der Sauerstoffeinfluss untersucht werden. Unter aeroben Bedingungen wurde ohne Fängerstoff kein 3HPA gebildet, wohingegen bei Carbohydrazidzugabe überraschenderweise im ersten Zyklus noch 138 mM 3HPA produziert werden konnten (Abb. 42). Die Ursache hierfür liegt in der sauerstoffbindenden Eigenschaft von Carbohydrazid als zusätzliche Schutzfunktion, die im Gegensatz zu Semicarbazid bei 35°C deutlich größer ist (Abb. 43). Mit Luftsauerstoff reagiert Carbohydrazid zu Wasser, Stickstoff und Kohlendioxid (Kurzer und Wilkinson, 1970) wodurch es demnach der Biotransformation nicht weiter als Fängerstoff zur Verfügung steht. Die vollständige Inaktivierung der Biomasse in der aeroben Biotransformation mit Carbohydrazidzugabe während des ersten Zyklus zeigt die starke Sauerstoffsensibilität der GDHt. Dies bestätigt die Literaturangaben zur Sauerstoffinaktivierung (Xu et al., 2009; Poznanskaya et al., 1977; Johnson et al., 1975; Stroinski et al., 1974) und steht im Gegensatz zu den Ergebnissen von Doleyres et al. (2005). Infolge der gezeigten Ergebnisse der hier vorliegenden Arbeit (Abschnitt 3.6) muss eine biotechnische Umsetzung zum Aktivitätserhalt der GDHt und zum Schutz des Fängerstoffs Carbohydrazid strikt anaerob erfolgen, um eine Oxidation beider zu verhindern. Interessanterweise beschrieb Kerwar et al. (1970) eine höhere Sauerstoffstabilität eines B₁₂-Analogons, das einen Ansatz für eine genetische Modifikation darstellen könnte.

Letztendlich wurde als Hauptursache der GDHt-Inaktivierung neben 3HPA Sauerstoff eindeutig bestätigt. In der Literatur wird ferner Glycerin als weitere Ursache postuliert (Kajiura et al., 2007; Seifert et al., 2001; Kajiura et al., 2001; Tobimatsu et al., 2000; Toraya, 2000; Daniel et al., 1998; Honda et al., 1980), wobei in diesen Arbeiten selbst bei geringer Glycerinzugabe nie auf einen strikten Sauerstoffausschluss hingewiesen wurde. Während die Enzymaktivitätsbestimmung mit DNPH von Smiley und Sobolov (1962) das Reduktionsmittel Natriumdithionit enthielt, verwendete man in der Bestimmung mit MBTH nach Toraya et al. (1977) kein Reduktionsmittel bzw. es wurden keine anaeroben Bedingungen angegeben. Nach eigenen Ergebnissen und weiteren Literaturangaben (Xu et al., 2009; Poznanskaya et al., 1977; Johnson et al., 1975; Stroinski et al., 1974; Wagner et al., 1966) muss Sauerstoff aber als ein weiterer Hauptgrund für die GDHt-Inaktivierung angesehen und vermieden werden. Somit sollten die Versuche zur Inaktivierung der GDHt idealerweise mit anaerob isoliertem Enzym und Carbohydrazid unter strikt anaeroben Testbedingungen erneut geprüft werden, um diesen Sachverhalt zu klären.

4.7 Nebenproduktbildung bei der Biotransformation von Glycerin

Bei der Biotransformation von Glycerin zu 3HPA mit *L. reuteri* kommt es zu Nebenreaktionen (Talarico et al., 1988; Sobolov und Smiley, 1960). Das Nebenprodukt 1,3-PDO kann in der HPLC verlässlich quantifiziert werden und entsteht zu einem Teil aus zelleigenen Reduktionsäquivalentreserven durch die Reduktion von 3HPA. In Repeated-Batch-Versuchen mit Carbohydrazid konnte jedoch auch noch im zehnten Zyklus 1,3-PDO nachgewiesen werden (Abb. 44 A). Eine Reduktion von 3HPA zu 1,3-PDO über den zelleigenen Reduktionsäquivalentepool ist somit unwahrscheinlich. Vielmehr muss es sich um eine andere Nebenreaktion handeln.

Da der pH-Wert während einer unregelmäßigen Biotransformation sinkt, muss eine Säure als weiteres Nebenprodukt vorliegen (Daten nicht gezeigt). Hierbei handelt es sich um 3HP, wobei sich deren Bestimmung in der HPLC-Analytik anspruchsvoll gestaltet (Abschnitt 3.9.1.1). Unter der Annahme, dass 3HP die einzige gebildete Säure darstellt, wurde das Laugesignal zur Quantifizierung herangezogen (Abb. 49 A). Somit wurde in Repeated-Batch-Biotransformationen neben 1,3-PDO auch 3HP über 10 Zyklen produziert (Abb. 44 B). Dies wurde durch den ermittelten konstanten Korrelationsfaktor in der HPLC-Analytik bestätigt (Abb. 45). Sowohl Talarico et al. (1988) als auch Sobolov und Smiley (1960) publizierten eine äquimolare Produktion von 1,3-PDO und 3HP bei *L. reuteri* und schlussfolgerten eine Dismutation von 3HPA. Eine Dismutation durch eine rein chemische Cannizzaro-Reaktion (Stenhouse, 1854; Cannizzaro, 1853), bei der unter stark alkalischen Bedingungen zwei Aldehydmoleküle zu ihrem korrespondierenden Alkohol und der Säure dismutieren, ist unwahrscheinlich. Zum einen wurden während der Biotransformation diese Bedingungen nicht erreicht, zum anderen spricht das Vorhandensein eines α -ständigen Wasserstoffatoms, das keine Disproportionierung sondern eine Aldoladdition des Aldehyds zur Folge hätte (Geissman, 1944), gegen diese Theorie. Da in der hier vorliegenden Arbeit generell Ganzzellbiokatalysatoren verwendet wurden, ist jedoch unklar, welches Enzym oder Enzymsystem diese Dismutaseaktivität besitzt. Eine mögliche Ursache hierfür könnte die 1,3-PDO-Oxidoreduktase (EC 1.1.1.202) darstellen, da sie sowohl eine spezifische Bindungsstelle für 3HPA aufweist, als auch das Koenzym NAD^+ trägt (Talarico et al., 1990), das die enzymatische Dismutation als Redoxsystem katalysiert (Kato et al., 1983). Aktuelle Literaturbelege zeigen eine Reduzierung des gebildeten 1,3-PDOs bei der einzelnen Deletion zweier verschiedener 1,3-PDO-Oxidoreduktasen (Stevens et al., 2011). In diesen Versuchen ohne Biomassewiederverwendung kann der Einfluss von Reduktionsäquivalentreserven nicht ausgeschlossen werden. Von einer dismutationsbedingten, äquimolaren Konzentrationsänderung der gebildeten 3HP wurde jedoch nicht berichtet, da unglücklicherweise keine Quantifizierung erfolgte. Aufgrund der indirekten Dismutation des alternativen Substrats 1,2-PDO über Propanal zu Propanol und Propionsäure durch die Dioldehydratase und weiterer Enzyme (Abb. 68) in *L. reuteri* DSM20016 (Sriramulu et al., 2008) und *K. pneumoniae* (Toraya et al., 1979) könnte eine geringe Expression dieses Enzymsystems oder deren unspezifische Verwendung von 3HPA die Ursache für die Dismutation sein. Nach Sriramulu et al. (2008) ist aufgrund der Biomasseanreicherung mit Glucose und Glycerin jedoch nur eine minimale Aktivität zu erwarten. Eine Verwendung von 1,2-PDO als zusätzliches Kosubstrat könnte klären, ob die Dismutation aufgrund einer Induktion dieses Stoffwechselweges vermehrt auftritt. Dass Alkoholdehydrogenasen zu einer Dismutation befähigt sind, wurde bereits mehrfach beschrieben (Svensson et al., 1996; Abeles und Lee, 1960). Jo et al. (2008) verwendeten erfolgreich eine Alkoholdehydrogenase von *E. coli* K-12 mit NAD^+ bzw. NAD(P)^+ als Koenzym, um 3HPA als Hauptsubstrat zu 3HP zu reduzieren. Überdies konnte mehrfach für weitere Alkoholdehydrogenasen mit NAD^+ als Kofaktor eine unspezifische Reaktion von 3HPA zu 3HP publiziert (Raj et al., 2008; Yasuda et al., 2006; Suthers und Cameron, 2005). Ob diese Alkoholdehydrogenasen eine Dismutaseaktivität besitzen oder weitere Enzyme daran beteiligt sind, ist allerdings unklar. Des Weiteren konnte bei einem genetisch veränderten *E. coli* zur Produktion von Poly-(3-Hydroxy-Propionat) gezeigt werden, dass durch den Einbau einer CoA-abhängigen Propionaldehyd-Dehydrogenase aus *Salmonella enterica* ebenfalls 3HPA in 3HP abgebaut werden kann (Andreeßen et al., 2010). Für das Vorhandensein dieses Enzyms in *L. reuteri* spricht zum einen eine Vorhersage aufgrund einer Shotgun-Sequenzierung bei *L. reuteri* mm4-1A (Muzny et al., 2011) und zum anderen die publizierte Verwertung von 1,2-PDO in Propionsäure und Propanol (Sriramulu et al.,

2008). Als eine weitere Quelle einer 3HP-Produktion konnte das aufgereinigte PduP-Protein aus *L. reuteri* gezeigt werden (Luo et al., 2011). Aufgrund dieser Vielzahl an möglichen Ursachen sollte, wie bereits von Slininger et al. (1983) gefordert, die Verwendung isolierter GDHt als erster Schritt Klarheit bringen. Jedoch wurde nach derzeitigem Kenntnisstand bei keiner Publikation zur Charakterisierung aufgereinigter GDHt (Macis et al., 1998; Talarico und Dobrogosz, 1990; Johnson et al., 1975; Stroinski et al., 1974; Schneider und Pawelkiewicz, 1966) eine 1,3-PDO- oder 3HP-Bildung gezeigt bzw. explizit ausgeschlossen und bedarf weiterführender Untersuchungen.

Für die Umsetzung in einem kostengünstigen, biotechnischen Prozess gilt es, Nebenprodukte zu minimieren. Durch die Verwendung von 500 mM Glycerin und 520 mM Carbohydrazid mit *L. reuteri*-LentiKats[®] zeigte sich innerhalb von 10 Zyklen eine durchschnittliche Nebenproduktbildung von 10 % (Abschnitt 3.4.2). In Zellsuspensionsversuchen zeigte sich bei steigender Carbohydrazid- und konstanter Glycerinkonzentration (500 mM) eine 84 %ige Reduktion der gebildeten 3HP-Menge auf 1,2 %. Dadurch würde, unter der Annahme, dass 3HP und 1,3-PDO in äquimolaren Mengen vorliegen, die Nebenproduktbildung auf einen restlichen Anteil von 2,4 % reduziert werden (Abb. 46). Hierbei wurde durch den maximalen 11,2fachen Überschuss der Hydrazinogruppen des Carbohydrazids zum eingesetzten Glycerin 3HPA effektiv gebunden und stand für eine weitere enzymatische Dismutation nicht mehr zur Verfügung. Unter der Voraussetzung, dass es sich bei der Dismutase und der GDHt um verschiedene Enzyme handelt, könnte eine Variation der Temperatur oder des pH-Wertes eine weitere Reduktion der Nebenprodukte bewirken. Dies setzt natürlich unterschiedliche Temperatur- und pH-Optima voraus. Tatsächlich wurde für eine Formaldehyddismutase von *Pseudomonas putida* ein Aktivitätsverlust von 82% bei 45°C im Vergleich zu 25°C gezeigt (Kato et al., 1983). Alternativ könnten bei erfolgreicher Identifizierung des Enzymsystems die benötigten Gene deletiert werden, solange diese nicht wachstumsrelevant sind.

Als weiteres Nebenprodukt ist Acrolein aufgetreten. Es wurde anfänglich fälschlicherweise als Endprodukt der bakteriellen Glycerinverwertung angesehen (Mills et al., 1954; Serjak et al., 1954), da die Acroleinbildung aus 3HPA unter sauren Bedingungen oder erhöhten Temperaturen bevorzugt wird (Pressman und Lucas, 1942). Da dieser Aldehyd äußerst reaktiv und hochgradig toxisch ist, musste die Herkunft geklärt werden. Es zeigte sich, dass die Lagerung der Biotransformationsproben im HPLC-Autosampler bei Raumtemperatur eine Acroleinbildung zur Folge hatte (Abb. 47), wodurch die Frage, ob Acrolein bereits in der Biotransformation entsteht, nicht beantwortet werden konnte. Weiterhin kann Acrolein während der verwendeten HPLC-Analytik unter sauren Bedingungen (5 mM Schwefelsäure) und erhöhter Temperatur (40°C) während der Chromatographie entstehen. Die alternative Messmethode zur 3HPA-Bestimmung, der colorimetrische Test, beruht jedoch auf der Umsetzung von 3HPA zu Acrolein und kann somit auch nicht zu dessen getrennter Quantifizierung von Acrolein herangezogen werden. Nichtsdestotrotz würde glücklicherweise in der Biotransformation entstandenes Acrolein unspezifisch von Carbohydrazid gebunden und somit ein toxischer Einfluss analog zu 3HPA unterbunden werden.

Nach der Biotransformation ohne Fängerstoff konnte eine Gelbfärbung der ursprünglich weißen Zellsuspension von *L. reuteri* durch das gebildete 3HPA beobachtet werden (Abb. 48). Eine solche Verfärbung durch die Reaktion der Aldehyde mit Aminosäuren wurde bereits in der Literatur belegt (Lubig et al., 1981; Hopwood et al., 1970). Bei der Verwendung von Semicarbazid zeigte sich hingegen keine Verfärbung, da mithilfe des Fängerstoffs kein freier reaktiver Aldehyd in größeren Mengen vorhanden war. Durch die Verwendung des Fängerstoffs Carbohydrazid erfolgte überraschenderweise nach mehreren Stunden unter Sauerstoffanwesenheit eine violette Verfärbung der Biotransformationsbrühe (Abb. 48). Hier wird eine ähnliche Reaktion wie bei dem Aldehydnachweisreagenz Purpald[®] vermutet. Hierbei kommt es zu einem Ringschluss zwischen der Carbonylgruppe des Aldehyds und der Hydrazino- bzw. Aminogruppe des Purpalds[®] und mithilfe von Sauerstoff kommt es zur Ausbildung der farbgebenden (Violett – Magenta) Struktur (Abb. 67). Eine Zyklisierung von ein oder mehreren Carbohydrazidmolekülen mit 3HPA ist denkbar, um eine Purpald[®]-ähnliche Struktur zu bilden und einen ähnlichen Farbkomplex zu erhalten. Diese Nebenreaktion ist glücklicherweise vernachlässigbar klein und kann durch den Ausschluss von Sauerstoff verhindert werden (Daten nicht gezeigt).

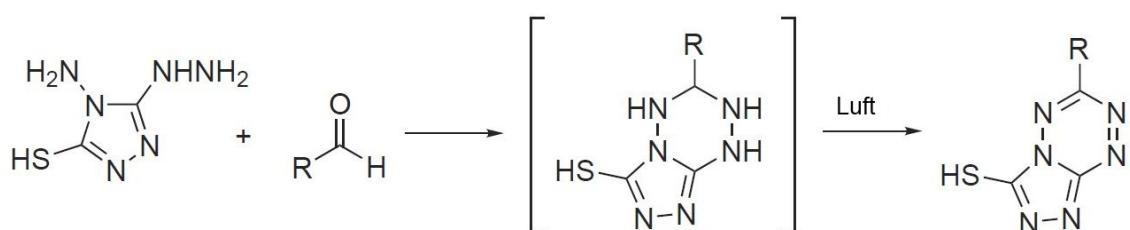


Abb. 67: **Reaktion des Aldehydnachweisreagenz Purpald mit Aldehyden**; Quelle: Sigma Aldrich - Technical Bulletin Purpald[®]

4.8 Biotransformation alternativer Substrate durch *L. reuteri*

Die Versuche aus Abschnitt 3.8 zeigen, dass *L. reuteri* neben Glycerin mit sinkender Geschwindigkeit auch 1,2-PDO und 1,2-EtOH verwerten kann (Abb. 49, Abb. 50). Durch die Verwendung von Ganzzellbiokatalysatoren kann jedoch nicht auf das reagierende Enzym oder Enzymsystem zurückgeschlossen werden, da *L. reuteri* sowohl eine Glycerin- als auch eine Dioldehydratase besitzt (Sriramulu et al., 2008). Ein Zellwachstum mit 1,2-PDO als einziger Kohlenstoffquelle konnte bereits durch Sriramulu et al. (2008) gezeigt werden und entspricht dem Reaktionsweg von *K. pneumoniae* (Toraya et al., 1979) und *Salmonella enterica* serovar Typhimurium LT2 (Sampson und Bobik, 2008). Bei dieser mehrstufigen Disproportionierung wird, alternativ zu einer Dismutase, das entstehende Propanal effektiv durch eine Alkoholdehydrogenase zu Propanol und eine Aldehyddehydrogenase zu PropionylCoA getrennt abgebaut. Durch die weitere Reaktion von PropionylCoA über Propionylphosphat zu Propionsäure erfolgt sogar eine Energiekonservierung (ATP) durch Substratstufenphosphorylierung (Abb. 68). Ob 1,2-EtOH als einzige Kohlenstoffquelle verwendet werden kann, wurde nicht überprüft bzw. in der Literatur belegt, ist jedoch aufgrund des Vorhandenseins der benötigten Enzyme (Abb. 5) sehr wahrscheinlich.

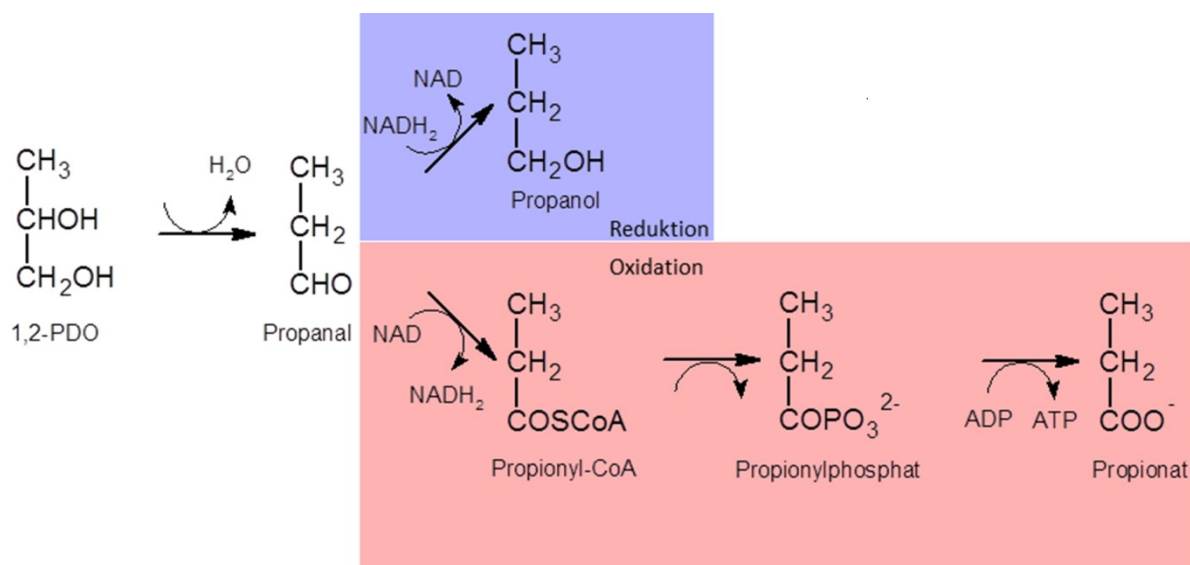


Abb. 68: Substratstufenphosphorylierung bei der Dismutation von 1,2-PDO zu Propionsäure und Propanol bei *L. reuteri* DSM 20016; nach Sriramulu et al. (2008)

Interessanterweise konnte bei der Biotransformation von 1,2-PDO und 1,2-EtOH im Gegensatz zu Glycerin keine Inaktivierung der Nebenproduktbildung beobachtet werden. Es ist fraglich, ob die Dismutase oder die Enzyme nach Abb. 68 durch die weniger toxischen alternativen Aldehyde (Propanal, Acetaldehyd) nicht inhibiert wurden.

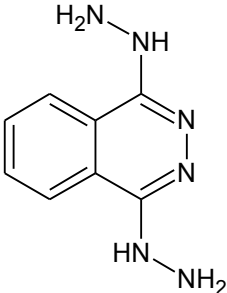
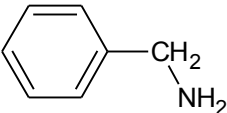
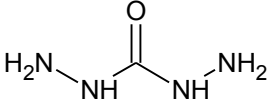
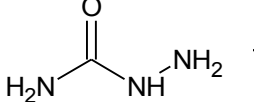
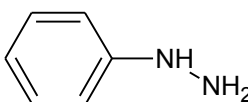
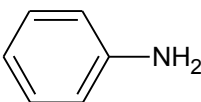
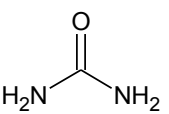
Bei der Verwendung von Carbohydrazid konnte eine Reduktion der Bildungsgeschwindigkeit der Säuren und der Alkohole gemessen werden (Abb. 51), da hier der entstehende Aldehyd sehr effektiv gebunden wird und der Reaktion nicht mehr zur Verfügung steht. Die geringfügig höheren Mengen des Alkohols gegenüber der Säure sind vermutlich auf zelleigene Reduktionsäquivalentreserven zurückzuführen.

4.9 Alternative Fängerstoffe zur Detoxifizierung von 3HPA

Schon frühzeitig wurden in der Chemie Fängerstoffe zur Identifizierung von Aldehyden bzw. Ketonen eingesetzt. Über die scharfen Schmelzpunkte der entstandenen Produkte konnte auf den Aldehyd bzw. das Keton rückgeschlossen werden. Bekanntester Vertreter ist hierbei 2,4-Dinitrophenylhydrazin (DNPH). Bei der Verwendung von 3-Methyl-2-benzthiazolinon Hydrazon (MBTH) kann spektrometrisch die Aldehydkonzentration im Reaktionsansatz bestimmt werden. Klassischerweise wird hierfür die enzymatische Reaktion abgestoppt und erst danach erfolgt die Fängerstoffzugabe. Bei dieser analytischen Methodik kann jedoch keine Schutzwirkung der Biomasse erreicht werden. Die Fängerstoffe Carbohydrazid, Semicarbazid, DNPH und MBTH gehören zu der Gruppe der Hydrazine, wobei es eine breite Vielfalt an weiteren Hydrazinderivaten zum Binden von Aldehyden gibt. Diese finden unter anderem als Harze in HPLC-Trennsäulenmaterialien Verwendung. Ein anderer Fängerstoff stellt Natriumhydrogensulfit (NaHSO_3) zur in situ Aldehydentfernung dar (Rütli et al., 2011; Rütli et al., 2007). Jedoch zeigte dieser in Lösung eine stark hemmende Wirkung auf den Biokatalysator *L. reuteri*. Aufgrund der Strukturähnlichkeit zu Carbohydrazid wurde Harnstoff als 3HPA-Fängerstoffalternative getestet, da es in einem biotechnischen Prozess eine kostengünstige Alternative zu Carbohydrazid darstellen könnte. Jedoch sind die reaktiven Gruppen keine reaktiven Hydrazino- sondern Aminogruppen. Bedauerlicherweise zeigte Harnstoff keinerlei Bindung mit 3HPA (Daten nicht gezeigt) und ist somit als Fängerstoff ungeeignet. Da Harnstoff aufgrund seines ungewöhnlichen pK_B -Wertes eine Sonderstellung

einnimmt, kann nicht direkt auf andere Amine geschlussfolgert werden. Diese müssen in weiteren Versuchen auf ihre Bindungseigenschaften hin näher untersucht werden. Weiterhin ist eine Vielzahl an chemischen Verbindungen als Fängerstoff denkbar. Hinsichtlich einer biotechnischen Anwendung müssen diese als Hauptkriterium effektiv 3HPA binden und des Weiteren sowohl kostengünstig als auch relativ einfach abtrennbar bzw. recycelbar sein. Als zusätzlich unabdingbare Eigenschaft gilt eine reversible Reaktion zwischen Aldehyd und Fängerstoff. Idealerweise liegt unter Biotransformationsbedingungen das Reaktionsgleichgewicht auf der Seite des gebundenen 3HPA. Somit kann unter anderen Reaktionsbedingungen in einem getrennten Reaktionsschritt zur Produktaufreinigung das gebundene 3HPA wieder regeneriert oder ein anderes Produkt wie z.B. Acrolein oder Acrylsäure gebildet werden. Eine Übersicht weiterer möglicher 3HPA-Fängerstoffe ist nach ihren Basenkonstanten geordnet in Tab. 17 dargestellt.

Tab. 17: Übersicht möglicher alternativer 3HPA-Fängerstoffe

Stoff/-gruppe	Struktur	3HPA-Bindung	pK _B
Einfaches Amin	$R-NH_2$	-	z.B. Methylamin 3,4 (20°C) (D'Ans et al., 1983)
Dihydralazin		-	4,06 und 8,06 (Falbe et al., 1999)
Benzylamin		-	4,6 (Baars und Christen, 2008) 4,97 (Carey und Sundberg, 2004)
Carbohydrazid		Sehr guter Fängerstoff	5,0 (eigene Messung, 35°C, Abb. 27)
Semicarbazid		Guter Fängerstoff	5,4 (eigene Messung, 35°C, Abb. 27)
Hydrazin	H_2N-NH_2	-	6,07 und 9,05 (25°C) (D'Ans et al., 1983)
Phenylhydrazin		-	8,8 (40°C) (D'Ans et al., 1983)
Anilin		-	9,4 (20°C) (D'Ans et al., 1983)
Harnstoff		Kein Fängerstoffverhalten (eigene Messung, Daten nicht gezeigt)	13,8 (Baars und Christen, 2008)

4.10 Analytik

Das Produkt 3HPA zeigte in der verwendeten HPLC im RID-Chromatogramm eine sehr gute Auftrennung, während sich im UVD-Chromatogramm ein ungewöhnlich langes Tailing offenbarte (Abb. 52). Die hier vermuteten Nebenreaktionen unter anderem zu Acrolein oder eine Polymerbildung stellen die Genauigkeit der Quantifizierung mit dieser Methode in Frage, wobei keine Literaturbelege zu diesem Phänomen gefunden wurden. In weiteren Versuchen konnte die 3HP-Elutionszeit identifiziert und deren Koelution mit Glycerin in der HPLC-Analytik (Abb. 57) gezeigt werden. Dies deckte einen größeren Glycerinverbrauch als zunächst angenommen auf. Nachfolgend musste bei der Auswertung der Chromatogramme vom RID-Signal des Glycerins über das UVD-Signal der 3HP-Anteil abgezogen werden. Dies offenbarte unter diesen Bedingungen die zwingende Verwendung sowohl eines UV- als auch eines RI-Detektors. In Abb. 49 A lässt sich zudem als alternative Bestimmung der 3HP erkennen, dass der Laugeverbrauch der Säurebildung entspricht.

Durch die Vermessung der hydrazidhaltigen Biotransformationsproben kam es bei dem bestehenden pH-Wert von 2,3 zu einer starken ionischen Interaktion der protonierten Aminogruppen (Ammonium-Ion) der Hydrazide mit der Sulfonsäuregruppe des HPX-87H-Säulenmaterials. Aufgrund dieser Salzbildung wurde der Trennmechanismus der Säule gestört (Abb. 59) und durch die doppelte Anzahl an Aminogruppen von Carbohydrazid im Gegensatz zu Semicarbazid nochmals verstärkt. Die ersten Ergebnisse einer alternativen HPLC-Analytik (ODS-Hypersil) waren leider unbefriedigend, da lediglich die 3HPA-Carbazone und Acrolein zuverlässig getrennt werden konnten (Abb. 60). Eine Aussage über das Substrat und die Nebenprodukte konnte nicht erfolgen, sodass lediglich eine Anwendung als Online-analytik für das Produkt denkbar ist. Diese ersten grundlegenden Untersuchungen bedürfen daher der weiteren Optimierung.

Entgegen der HPLC-Analytik stellte sich der colorimetrische Test als sehr robuste Methode zur Messung von 3HPA dar, da keiner der eingesetzten Fängerstoffe das Ergebnis beeinflusste (Abb. 61). Aufgrund der Anfälligkeit des HPX-87H-Säulenmaterials auf die Fängerstoffe ist dies die einzige Möglichkeit, 3HPA quantitativ sicher zu erfassen. Durch den sehr einfachen Testansatz ist auch eine automatisierte Durchführung z.B. durch einen Pipettierroboter denkbar, sofern die verwendeten Materialien wegen der verwendeten rauchenden Salzsäure säureresistent sind. Der gezeigte Schwachpunkt der Absorptionsabnahme bei Aldehydüberschuss (Abschnitt 3.9.2.2) kann durch eine entsprechende Verdünnung auf die maximal erreichbare 3HPA-Konzentration vermieden werden. Alternativ dazu kann dank des orange-roten Farbumschlags eine zweite Absorption im längerwelligen Spektralbereich zur Kontrolle gemessen werden. Einzig nachteilig ist nur, dass auch dieser Test, wie die HPX-87H-Analytik, nicht zwischen in der Biotransformation und während der Probenaufarbeitung entstandenem Acrolein unterscheiden kann.

4.11 Mögliche industrielle Umsetzung

Eine industrielle Umsetzung der 3HPA-Herstellung mit *L. reuteri* war bisher infolge der sehr geringen Standzeit des Biokatalysators nicht rentabel. Aufgrund der in dieser Arbeit gezeigten Verbesserung der 3HPA-Detoxifizierung durch Fängerstoffe (insbesondere Carbohydrazid) sowie die daraus resultierende erhebliche Biokatalysatorstandzeitverlängerung (33fach, Abb. 31), die Erhöhung der Produktmenge (67fach im Repeated-Batch, Abb. 31 und 17fach im Batch, Abb. 37) und die Produktivitätsverbesserung ($21,6 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$, Abb. 66) können nun unter Berücksichtigung der hier nochmals bestätigten extremen Sauerstoffempfindlichkeit (Abb. 42) biotechnische Umsetzungen konzipiert werden.

Zunächst stellt sich die Frage der Biomasseanzucht. Da *L. reuteri* nicht auf Glycerin wachsen kann, muss ein Wachstumssubstrat (z.B. Glucose) verwendet werden. Um in diesem ersten unrentablen Schritt eine zusätzliche Gewinnschöpfung zu erzielen, könnte in der anaeroben Fed-Batch-Fermentation z.B. Mannitol aus einem Fructose/Glucose-Gemisch (Ortiz et al., 2012; Rodríguez et al., 2012; von Weymarn, 2002) hergestellt werden, während Lactat generell als nutzbares Fermentationsendprodukt anfällt. Da die Biotransformation von Glycerin zu 3HPA wachstumsentkoppelt ist, wird eine Immobilisierung von Ganzzellbiokatalysatoren favorisiert, wodurch auftretende Scherkräfte minimiert und der Wechsel des Biotransformationsmediums ungemein vereinfacht werden. Zusätzlich könnten dadurch unkompliziert Regenerationsschritte mit Glucose- bzw. Wachstumsmedium zur zelleigenen GDHt-Reaktivierung eingefügt werden und bei entsprechender einfacher Automatisierung ein anaerober Medienwechsel mit Waschschritten unproblematisch zu realisieren ist.

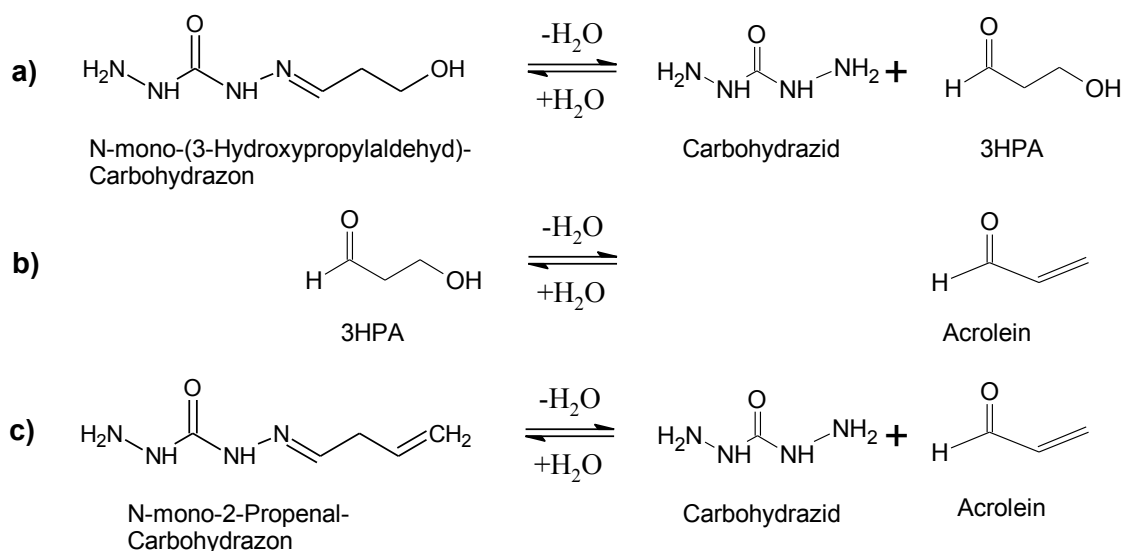
Die in der hier vorliegenden Arbeit zur Immobilisierung der Ganzzellbiokatalysatoren gewählten LentiKats[®] wurden bereits für diverse Anwendungen im großtechnischen Maßstab hergestellt. Jedoch könnte eine Immobilisierung in einer stabileren Kugelform z.B. mittels Jetcutter (Prüße et al., 1998a; Prüße et al., 1998b) von Vorteil sein. Für die Prozessführung zur Herstellung von 3HPA wurde eine strikt anaerobe Fed-Batch-Biotransformation mit Carbohydrazid als optimal ermittelt (Abb. 66). Bei der Wiederverwendung der Immobilisate wird folglich eine Repeated-Fed-Batch-Biotransformation als optimal angesehen. Als alternative Immobilisationstechnik könnte zudem die Immobilisierung von an Träger gebundener GDHt in Betracht gezogen werden. Falls es sich bei der Dismutase und der GDHt um unterschiedliche Enzyme handelt, hätte diese Methode den Vorteil der nicht stattfindenden Dismutation von 3HPA zu 1,3-PDO und 3HP. Der weitaus größere Nachteil bestände neben den immens höheren Herstellungskosten jedoch in dem Verlust einer zelleigenen GDHt-Regenerationsfähigkeit. Sodass für die Wiederherstellung des B₁₂-Koenzyms benötigte reaktivierende Enzym zusätzlich aufgereinigt werden müsste und in Verbindung mit den kostenintensiven Co-Substraten ATP und dem Koenzym B₁₂ ein biotechnischer Prozess auf dem Level einer Plattformchemikalie nicht rentabel ist. Diese kostenintensive Strategie der Nebenproduktreduzierung ist zudem überflüssig, da bereits in der hier vorliegenden Arbeit die Nebenproduktbildung durch den Einsatz des Fängerstoffs Carbohydrazid von 10 % auf bis zu 2,4 % deutlich gesenkt werden konnte. Generell ist die Verwendung von *L. reuteri* Ganzzellbiokatalysatoren z.B. für pharmazeutische Anwendungen unproblematisch, da einige Stämme den GRAS-Status (generally known as safe) besitzen.

Durch den Einsatz der Fängerstoffe und der daraus entstehenden 3HPA-Hydrazone gibt es mehrere Möglichkeiten der Verfahrensentwicklung, um unterschiedliche Produkte zu erhalten. All diese Überlegungen basieren auf der Grundlage einer reversiblen Reaktion der 3HPA-Fängerstoff-Carbazonbildung. Bereits in der Arbeit von Slininger et al. (1983) mit

Semicarbazid zeigte sich diese Reversibilität, wobei eine Abnahme des 3HPA-Semicarbazons nach einem Maximalwert beobachtet werden konnte. Des Weiteren wurden bereits in einer Dissertation (Ulmer, 2008) Destillation, Extraktion und Verdrängung als mögliche Aufarbeitungswege für das 3HPA-Semicarbazon diskutiert und können nun durch die in der hier vorliegenden Arbeit erworbenen Erkenntnisse mit Carbohydrazid auf das 3HPA-Carbazon erweitert und auf die Hydrazide verallgemeinert werden. Generell ist dabei zur Kostenreduktion ein Kreislaufprinzip des Fängerstoffs zwingend erforderlich und als Endprodukte Acrolein, 3HPA sowie 3HP und 1,3-PDO denkbar.

Endprodukt Acrolein:

Die Herstellung von Acrolein durch saure Katalyse bei erhöhten Temperaturen ist die einfachste Möglichkeit der Fängerstoffregenerierung (Vollenweider und Lacroix, 2004). Dieser Reaktionsweg wird durch die Bildung von Acrolein während der HPLC-Analytik und im colorimetrischen Test mit dem 3HPA-Carbazon und 3HPA-Semicarbazon bestätigt. Dabei steht nach Hall und Stern (1950) Acrolein in einer Gleichgewichtsreaktion mit 3HPA (Gleichung 3 b). Da sich auch die Bindung von 3HPA an Carbohydrazid in einem Gleichgewicht befindet (Gleichung 3 a), kann vom 3HPA-Carbazon über 3HPA eine Reaktion zu Acrolein erfolgen. Dieses wird während der Biotransformation oder der Produktaufarbeitung sofort analog zu 3HPA unspezifisch durch Carbohydrazid gebunden und detoxifiziert (Gleichung 3 c).



Gleichung 3: Gleichgewichtsreaktionen zwischen (a) 3HPA und Carbohydrazid mit dessen Carbazon, (b) 3HPA und Acrolein, (c) Acrolein und Carbohydrazid mit dessen Carbazon

In einem von der Biotransformation getrennten Prozess wird durch eine starke pH-Wert-Senkung der zellfreien Biotransformationsbrühe die Bildung von Acrolein favorisiert und dieses durch eine geeignete Extraktionsmethode (Stripping, Vakuumextraktion) aus dem Reaktionsgleichgewicht entfernt. Dieses Acrolein kann nachfolgend in bestehende Erdölbasierte Verfahrenswege für z.B. Acrylsäure (Superabsorber) eingeschleust werden und somit petrochemisch erzeugtes Acrolein ersetzen. Zudem kann von besonderem Interesse dieses so gewonnene erdölfreie „biologische Acrolein“ für die Methioninherstellung (Futterergänzungsmittel) in der ökologischen Viehzucht sein.

Endprodukt 3HPA:

Entgegen der Acroleinbildung ist die Rückgewinnung von 3HPA aus dem 3HPA-Carbazon schwieriger. Nach Ulmer (2008) wurde die Möglichkeit einer Verdrängungsreaktion von 3HPA mit Aceton aus dem Semicarbazon aufgezeigt. Ob dieses Verfahren auf Carbohydrazid anwendbar ist, muss jedoch erst überprüft werden. Die beschriebene Auskristallisation des Semicarbazons bei 4°C konnte bei der Verwendung von Carbohydrazid nicht beobachtet werden. Eine Erhitzung der Biotransformationsbrühe zur Auskristallisation würde indes zur Acroleinbildung führen und ist somit nicht für die 3HPA-Herstellung anwendbar.

Für eine bessere Abtrennung des 3HPA-Carbazons und einer anschließenden 3HPA-Regeneration ist ein Mehrphasensystem denkbar. Hierbei findet während der Biotransformation eine zusätzliche organische Phase mit einem hydrophob-modifizierten Hydrazinderivat basierend auf Tab. 17 Anwendung, um das entstehende 3HPA zu binden und der wässrigen Phase zu entziehen. Für eine solche Alkylierung des Fängerstoffs konnte bereits ein positiver induktiver Effekt gezeigt werden (Hinman, 1958). Dadurch würde der nukleophile Angriff der Hydrazinogruppe unterstützt werden, wohingegen eine aromatische Modifikation analog zu DNPH eine zu starke 3HPA-Bindung an den hydrophoben Fängerstoff bewirkt und eine Regeneration von 3HPA aus dem Hydrazon erschweren würde.

Die Aufreinigung des 3HPA-Carbazons aus dieser Biotransformationsbrühe kann über eine einfache Phasentrennung erfolgen, wobei die wässrige Phase der Biotransformation wieder zugeführt werden kann. Durch die Verwendung einer 3HPA-Verdrängungschemikalie in der organischen Phase z.B. ein Aceton/Wassergemisch nach Ulmer (2008) führt zu einer Freisetzung von 3HPA. Schließlich muss zum Erhalt des Kreislaufes zusätzlich zum Fängerstoff auch die Verdrängungschemikalie regeneriert werden. Der Vorteil dieses Konzeptes ist eine vereinfachte Produktaufreinigung ohne hohen Energieaufwand. Letztendlich hängt diese theoretische Prozessführung hauptsächlich von der Diffusionsgeschwindigkeit der 3HPA-Moleküle zur Phasengrenze ab, da der hydrophobe Fängerstoff nicht in der wässrigen Phase vorliegt. Erst an der Phasengrenze kann 3HPA von dem modifizierten Fängerstoff gebunden und somit detoxifiziert werden. Hierbei darf es zu keiner toxischen Akkumulation von freiem 3HPA in der wässrigen Phase kommen. Eine Emulsion mit fein verteilten Micellen könnte die Bindung von 3HPA aufgrund des kürzeren Diffusionsweges beschleunigen und die Detoxifizierung verbessern. Nachteilig hingegen dürfte sich die Verwendung von Rohglycerinen auswirken, da hydrophobe Bestandteile (z.B. Fettsäuren) in der organischen Phase akkumulieren und den Prozess auf Dauer negativ beeinflussen.

Endprodukt 3HP und 1,3-PDO:

Die zuvor diskutierten Möglichkeiten gehen von einem Endprodukt aus. Im Abschnitt 4.7 wurde hingegen die Möglichkeit der biologischen Dismutation zu 3HP und 1,3-PDO diskutiert. Sowohl 3HP (Henry et al., 2010) als auch 1,3-PDO (Saxena et al., 2009) sind für die chemische Industrie als Plattformchemikalie z.B. für Polymere von sehr großem Interesse. Dabei werden bisher beide Stoffe getrennt in komplexen Wachstumsmedien unter anderem mit aufwendig genetisch veränderten Mikroorganismen durch klassische Fermentation hergestellt (Luo et al., 2011; Andreeßen et al., 2010; Tang et al., 2009; Saxena et al., 2009; Yasuda et al., 2006; Suthers und Cameron, 2005). Des Weiteren zielt ein Verbundprojekt von Cargill und Novozymes mit Unterstützung der amerikanischen Energiebehörde (1,5 Millionen US-\$) auf eine Acrylsäureherstellung über 3HP aus nachwachsenden Rohstoffen (Zucker) mit einem gentechnisch modifizierten Mikroorganismus ab (Cargill, 2008). Eine gekoppelte Herstellung von 1,3-PDO und 3HP wurde bereits patentiert

(Yasuda et al., 2006). Nachteilig hierbei ist jedoch die Verwendung gentechnisch veränderter Biokatalysatoren und eines komplexen Mediums mit weiteren Stoffwechselnebenprodukten.

In einer Biotransformation mit *L. reuteri* könnte unter nicht wachsenden Bedingungen und Wiederverwendung der Biomasse in einem einfachen Puffer durch Dismutation theoretisch das eingesetzte Glycerin vollständig zu jeweils 50 % in 3HP und 1,3-PDO umgesetzt werden. Als Grundidee dient hierbei die sofortige Detoxifizierung mittels Dismutation, wodurch keine toxischen Produktkonzentrationen erreicht werden. Als „Pufferspeicher“ für das entstehende 3HPA könnte hierbei Carbohydrazid in geringen Mengen fungieren. Es würde überschüssiges 3HPA binden und aufgrund der reversiblen Carbazonbildung (Gleichung 2) durch die Dismutation wieder regeneriert. Als Voraussetzung muss gleichwohl die Dismutase bzw. das verantwortliche Enzymsystem sowohl identifiziert als auch induziert bzw. optimiert werden. Die Herausforderung dieser Prozessführung liegt in der Zuführung von Glycerin, da hierbei keine toxischen 3HPA-Konzentrationen entstehen dürfen.

Die Vorteile liegen in der Kombination von zwei begehrten Endprodukten, dem einfachen wässrigen Medium, das eine Aufreinigung immens vereinfacht und einem idealerweise fast vollständigem, wachstumsunabhängigen Glycerinumsatz ohne weitere Nebenprodukte bei hoher Standzeit. Weiterhin müssen bei einer notwendigen genetischen Manipulation keine Fremdgene eingefügt, sondern nur die Expressionsrate erhöht werden, wobei genetische Systeme für *L. reuteri* bereits bestehen (Stevens et al., 2011; Santos et al., 2011). Unter der Voraussetzung, dass für die Dismutation nur ein Enzym notwendig ist, sind lediglich zwei Enzyme an dem gesamten Prozess beteiligt. Diese stellt für die Herstellung von 3HP die kleinstmögliche Anzahl dar (Henry et al., 2010; Jiang et al., 2009).

5. Schlussfolgerung & Ausblick

Zunächst wurde in dieser Arbeit die Biomasseproduktion von *L. reuteri* auf ein Höchstmaß an GDHt-Aktivität unter reproduzierbaren anaeroben Bedingungen optimiert. Hierdurch konnte der Anteil an den kostenintensiven Komplexstoffen Pepton und Hefeextrakt stark reduziert werden. Um eine weitere Kostensenkung zu erreichen, muss der essentielle Fleischextrakt durch eine geeignete kostengünstige Alternative ersetzt werden.

Bei der Optimierung der Biotransformation von Glycerin zu 3HPA mit *L. reuteri* wurde das Produkt 3HPA als reaktiver Aldehyd für die Inaktivierung der GDHt identifiziert. Um die toxische Wirkung zu minimieren, ist folglich eine In-Situ-Produktentfernung nötig. Diese wurde mit Fängerstoffen durch die Carbazonbildung als „Schutzgruppe“ realisiert und diente hauptsächlich dem Schutz der GDHt bzw. der Biomasse und nicht als Reduktionsschutz. Dabei ist die Fängerstoffverwendung mindestens im äquivalenten Überschuss gegenüber dem eingesetzten Glycerin zwingend notwendig. Durch die Ausschaltung der Produkttoxizität wurde Sauerstoff als ein weiterer Hauptgrund für die GDHt-Inaktivierung gezeigt und muss in der Biotransformation vermieden werden. Schließlich wurde mit dem Fängerstoff Carbohydrazid eine Substanz gewählt, die nicht nur mit seinen zwei Hydrazinogruppen effektiv 2 Moleküle 3HPA binden kann, sondern zusätzlich auch Sauerstoff effizient entfernt und somit einen idealen Schutz gewährleistet. Dadurch wurde nicht nur eine längere Standzeit, sondern auch eine deutlich erhöhte Produktkonzentration erreicht. Dies ermöglicht eine biotechnische Anwendung aufgrund der deutlich erhöhten Produktivität. Aus den gezeigten Ergebnissen der Repeated-Batch- und Fed-Batch-Biotransformation wird eine anaerobe Repeated-Fed-Batch-Prozessführung mit Immobilisaten favorisiert. Mithilfe der Immobilisierung wird die Biomasse effizient vor mechanischer Einwirkung geschützt und der anaerobe Medienwechsel im Hinblick auf eine biotechnische Umsetzung immens erleichtert. Zusätzlich wurde eine weitere Kostensenkung bei der Zugabe von Carbohydrazid im starken Überschuss durch eine Reduktion der Nebenprodukte erreicht.

Das in dieser Arbeit verwendete Bakterium *L. reuteri* hat die Besonderheit, Glycerin nur reduktiv zu verwerten. Andere Bakterien (z.B. *K. pneumoniae*) sind hingegen in der Lage, mit Glycerin als einziger Kohlenstoffquelle zu wachsen. Nichtsdestotrotz ist unabhängig davon eine universelle Anwendung von Fängerstoffen zur 3HPA-Produktion in einem zweistufigen Prozess möglich. In einem ersten Schritt zur Biomasseanzucht können durch klassische Fermentation verschiedenste Wertschöpfungsprodukte wie z.B. 1,3-PDO aus Glycerin, Lactat aus Glucose oder Mannitol aus Fructose hergestellt werden. Hierbei darf kein Fängerstoff zugegeben werden, um den Stoffwechsel nicht negativ zu beeinflussen. In einem zweiten Schritt wird in einer anaeroben Biotransformation unter Zugabe von einem Fängerstoff im Überschuss kontinuierlich 3HPA produziert und bedarf keiner Knock-out Mutanten der oxidativen Glycerinverwertung wie in Yasuda et al. (2006).

Letztendlich konnten theoretische Möglichkeiten der Prozessführung zur Carbazonregeneration für die Produkte Acrolein, 3HPA sowie 3HP und 1,3-PDO aufgezeigt werden. Dabei kann der verwendete Rohstoff Glycerin aus nachwachsenden Rohstoffen bezogen und 3HPA in bestehende petrochemische Synthesewege eingeschleust werden. Hierbei wurde der Einsatz von Rohglycerinen zur Rohstoffkostensenkung noch nicht diskutiert und bedarf weiterführender Untersuchungen.

Für eine biotechnische Umsetzung gilt es schließlich, die Produktaufarbeitung zu optimieren und die gezeigten Prozessführungen zu verifizieren.

6. Literatur

- Abeles RH, Brownstein AM und Randles CH (1960)** Beta-Hydroxypropionaldehyde, An Intermediate in the Formation of 1,3-Propanediol by *Aerobacter aerogenes*. *Biochimica et Biophysica Acta*, 41 (3): 530-531
- Abeles RH und Lee HA (1960)** The Dismutation of Formaldehyde by Liver Alcohol Dehydrogenase. *Journal of Biological Chemistry*, 235 (5): 1499-1503
- Abeles RH und Lee HA (1961)** An Intramolecular Oxidation-Reduction Requiring a Cobamide Coenzyme. *Journal of Biological Chemistry*, 236 (8): 2347-2350
- Aleljung P, Shen W, Rozalska B, Hellman U, Ljungh Å und Wadström T (1994)** Purification of collagen-binding proteins of *Lactobacillus reuteri* NCIB 11951. *Current Microbiology*, 28 (4): 231-236
- Andreeßen B, Lange AB, Robenek H und Steinbüchel A (2010)** Conversion of Glycerol to Poly(3-Hydroxypropionate) in Recombinant *Escherichia coli*. *Applied and Environmental Microbiology*, 76 (2): 622-626
- Andres S, Wiezer A, Bendfeldt H, Waschowitz T, Toeche-Mittler C und Daniel R (2004)** Insights into the genome of the enteric bacterium *Escherichia blattae*: Cobalamin (B₁₂) biosynthesis, B₁₂-dependent reactions, and inactivation of the gene region encoding B₁₂-dependent glycerol dehydratase by a new Mu-like prophage. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*, 8 (3): 150-168
- Arntz D, Haas T, Müller A und Wiegand N (1991)** Kinetic-Studies on the Hydration of Acrolein. *Chemie Ingenieur Technik*, 63 (7): 733-735
- Arntz D und Wiegand N (1991)** Method of preparing 1,3-propanediol. Degussa AG, DE [US 5,015,789]
- Arques JL, Fernandez J, Gaya P, Nunez M, Rodriguez E und Medina M (2004)** Antimicrobial activity of reuterin in combination with nisin against food-borne pathogens. *International Journal of Food Microbiology*, 95 (2): 225-229
- Årsköld E, Lohmeyer-Vogel E, Cao R, Roos S, Radstom P und van Niel EWJ (2008)** Phosphoketolase pathway dominates in *Lactobacillus reuteri* ATCC 55730 containing dual pathways for glycolysis. *Journal of Bacteriology*, 190 (1): 206-212
- Axelsson L (1998)** Lactic acid bacteria: classification and physiology. In: *Lactic acid bacteria: microbiological and functional aspects*. Salminen S, Wright A und Ouwehand A (eds) 2. Auflage, 1-72, Marcel Dekker Inc., New York
- Axelsson LT, Chung TC, Dobrogosz WJ und Lindgren SE (1989)** Production of a Broad Spectrum Antimicrobial Substance by *Lactobacillus reuteri*. *Microbial Ecology in Health and Disease*, 2 (2): 131-136
- Baars G und Christen HR (2008)** Chemie. hep-Verlag, Bern
- Baimuratov E, Kalontarov IY und Saidov DS (1993)** The Influence of Reactive Dyes on Thermo-, γ -Radiation and Photooxidative Degradation of Stressed Polyvinyl Alcohol. *International Journal of Polymeric Materials*, 19 (3-4): 193-199
- Barbirato F, Camarasaclaret C, Grivet JP und Bories A (1995)** Glycerol Fermentation by A New 1,3-Propanediol-Producing Microorganism - *Enterobacter agglomerans*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 43 (5): 786-793

- Barbirato F, Grivet JP, Soucaille P und Bories A (1996)** 3-Hydroxypropionaldehyde, an inhibitory metabolite of glycerol fermentation to 1,3-propanediol by enterobacterial species. *Applied and Environmental Microbiology*, 62 (4): 1448-1451
- Barbirato F, Soucaille P, Camarasa C und Bories A (1998)** Uncoupled glycerol distribution as the origin of the accumulation of 3-hydroxypropionaldehyde during the fermentation of glycerol by *Enterobacter agglomerans* CNCM 1210. *Biotechnology and Bioengineering*, 58 (2-3): 303-305
- Bauer R, Cowan DA und Crouch A (2010a)** Acrolein in Wine: Importance of 3-Hydroxypropionaldehyde and Derivatives in Production and Detection. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58 (6): 3243-3250
- Bauer R, du Toit M und Kossmann J (2010b)** Influence of environmental parameters on production of the acrolein precursor 3-hydroxypropionaldehyde by *Lactobacillus reuteri* DSMZ 20016 and its accumulation by wine lactobacilli. *International Journal of Food Microbiology*, 137 (1): 28-31
- Bickerstaff GF (1997)** Immobilization of enzymes and cells. In: *Immobilization of Enzymes and Cells*. Bickerstaff GF (ed), 1-11, Humana Press Inc., Totowa
- Buchholz K und Kasche V (1997)** Biokatalysatoren und Enzymtechnologie. WILEY-VCH Verlag, Weinheim
- Büning-Pfaue H und Rehm H-J (1972)** Production of Aldehyde in Batch Fermentation by *Pseudomonas aeruginosa* Growing on Decanol. *Archiv für Mikrobiologie*, 86 (3): 231-240
- Cannizzaro S (1853)** Ueber den der Benzoësäure entsprechenden Alkohol. *Annalen der Chemie und Pharmacie*, 88 (1): 129-130
- Carey FA und Sundberg RJ (2004)** Organische Chemie: Ein weiterführendes Lehrbuch. John Wiley & Sons, Inc., New York
- Cargill I (2008)** Cargill and Novozymes to enable production of acrylic acid via 3HPA from renewable raw materials.
<http://www.cargill.com/news/releases/2008/NA3007665.jsp>, Zugriff 10.09.2012
- Casas IA und Dobrogosz WJ (2000)** Validation of the Probiotic Concept: *Lactobacillus reuteri* Confers Broad-spectrum Protection against Disease in Humans and Animals. *Microbial Ecology in Health and Disease*, 12: 247-285
- Chen CN, Sung HW, Liang HF und Chang WH (2002)** Feasibility study using a natural compound (reuterin) produced by *Lactobacillus reuteri* in sterilizing and crosslinking biological tissues. *Journal of Biomedical Materials Research*, 61 (3): 360-369
- Chen Z, Liu H und Liu D (2009)** Regulation of 3-hydroxypropionaldehyde accumulation in *Klebsiella pneumoniae* by overexpression of *dhaT* and *dhaD* genes. *Enzyme and Microbial Technology*, 45 (4): 305-309
- Chibata I, Tosa T und Sato T (1986)** Biocatalysis - Immobilized cells and enzymes. *Journal of Molecular Catalysis*, 37 (1): 1-24
- Chung TC, Axelsson L, Lindgren SE und Dobrogosz WJ (1989)** In Vitro Studies on Reuterin Synthesis by *Lactobacillus reuteri*. *Microbial Ecology in Health and Disease*, 2 (2): 137-144

- Circle SJ, Stone L und Boruff CS (1945)** Acrolein Determination by Means of Tryptophane - A Colorimetric Micromethod. *Industrial and Engineering Chemistry, Analytical Edition*, 17 (4): 259-262
- Clariant GmbH (1999)** Mowiol® Polyvinyl Alcohol. Frankfurt/Main, Clariant GmbH
- Cleusix V, Lacroix C, Vollenweider S und Le Blay G (2008)** Glycerol induces reuterin production and decreases *Escherichia coli* population in an in vitro model of colonic fermentation with immobilized human feces. *FEMS Microbiology Ecology*, 63 (1): 56-64
- Cleusix V, Lacroix C, Vollenweider S, Duboux M und Le Blay G (2007)** Inhibitory activity spectrum of reuterin produced by *Lactobacillus reuteri* against intestinal bacteria. *BMC Microbiology*, 7 (1): 101
- Conant JB und Bartlett PD (1932)** A Quantitative Study Of Semicarbazone Formation. *Journal of the American Chemical Society*, 54 (7): 2881-2899
- Condon S (1987)** Responses of Lactic-Acid Bacteria to Oxygen. *FEMS Microbiology Reviews*, 46 (3): 269-280
- Cuisia DG (1983)** Prevention of corrosion in aqueous solutions. Dearborn Chemical Company, US [US 4,399,098]
- D'Ans J, Synowietz C und Lax E (1983)** Taschenbuch für Chemiker und Physiker. Springer-Verlag, Berlin · Heidelberg
- Daniel R, Bobik TA und Gottschalk G (1998)** Biochemistry of coenzyme B₁₂-dependent glycerol and diol dehydratases and organization of the encoding genes. *FEMS Microbiology Reviews*, 22 (5): 553-566
- de la Calle MB und Anklam E (2005)** Semicarbazide: occurrence in food products and state-of-the-art in analytical methods used for its determination. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 382 (4): 968-977
- de Man JC, Rogosa M und Sharpe ME (1960)** A Medium For The Cultivation Of Lactobacilli. *Journal of Applied Microbiology*, 23 (1): 130-135
- Dobrogosz WJ und Lindgren SE (1988)** Antibiotic Reuterin. Probiologics International Inc., US [WO 88/08452]
- Dobson R, Gray V und Rumbold K (2012)** Microbial utilization of crude glycerol for the production of value-added products. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 39 (2): 217-226
- Doleyres Y, Beck P, Vollenweider S und Lacroix C (2005)** Production of 3-hydroxypropionaldehyde using a two-step process with *Lactobacillus reuteri*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 68 (4): 467-474
- Douillard JY und Hoffman T (1983)** Enzyme-linked immunosorbent assay for screening monoclonal antibody production using enzyme-labeled second antibody. In: *Methods in Enzymology, Immunochemical Techniques Part E: Monoclonal Antibodies and General Immunoassay Methods*. Langone JJ (ed) 92. Auflage, 168-174, Academic Press, New York
- Duwat P, Sourice S, Cesselin B, Lamberet G, Vido K, Gaudu P, Le Loir Y, Violet F, Loubière P und Gruss A (2001)** Respiration Capacity of the Fermenting Bacterium *Lactococcus lactis* and Its Positive Effects on Growth and Survival. *Journal of Bacteriology*, 183 (15): 4509-4516

- El-Ziney MG und Debevere JM (1998)** The effect of Reuterin on *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli* O157:H7 in milk and cottage cheese. *Journal of Food Protection*, 61 (10): 1275-1280
- El-Ziney MG, Arneborg N, Uyttendaele M, Debevere J und Jakobsen M (1998)** Characterization of growth and metabolite production of *Lactobacillus reuteri* during glucose/glycerol cofermentation in batch and continuous cultures. *Biotechnology Letters*, 20 (10): 913-916
- El-Ziney MG, van den Tempel T, Debevere J und Jakobsen M (1999)** Application of reuterin produced by *Lactobacillus reuteri* 12002 for meat decontamination and preservation. *Journal of Food Protection*, 62 (3): 257-261
- El-Ziney MG und Jakobsen M (2009)** Effectiveness of reuterin alone and in combination with nisin or other food contact surfaces sanitizers and cleaners for disinfection of stainless steel surfaces contaminated with *Escherichia coli* and *Listeria innocua*. *Journal of Food Agriculture & Environment*, 7 (3-4): 145-149
- Ellis GP (1959)** The Maillard reaction. *Advances in Carbohydrate Chemistry*, 14: 63-134
- Falbe J, Regitz M, Amelingmeier E, Berger M und Bergsträsser U (1999)** Römpp - Lexikon Chemie (2.0), Thieme, Stuttgart (Computerprogramm)
- Forage RG und Foster MA (1982)** Glycerol Fermentation in *Klebsiella pneumoniae* - Functions of the Coenzyme-B₁₂-Dependent Glycerol and Diol Dehydratases. *Journal of Bacteriology*, 149 (2): 413-419
- Forage RG und Foster MA (1979)** Resolutin of the coenzyme B₁₂-independent dehydratases of *Klebsiella sp.* and *Citrobacter freundii*. *Biochimica et Biophysica Acta - Enzymology*, 569 (2): 249-258
- Forsberg CW (1987)** Production of 1,3-Propanediol from Glycerol by *Clostridium acetobutylicum* and Other Clostridium Species. *Applied and Environmental Microbiology*, 53 (4): 639-643
- Fuchs G, Alber B und Marx A (2007)** Ein Enzym zur Herstellung von Methylmalonatsemialdehyd oder Malonatsemialdehyd. Evonik Degussa GmbH, DE [DE 102006025821 A1]
- Gänzle MG, Holtzel A, Walter J, Jung G und Hammes WP (2000)** Characterization of reutericyclin produced by *Lactobacillus reuteri* LTH2584. *Applied and Environmental Microbiology*, 66 (10): 4325-4333
- Gaudu P, Vido K, Cesselin B, Kulakauskas S, Tremblay J, Rezaïki L, Lamberet G, Sourice S, Duwat P und Gruss A (2002)** Respiration capacity and consequences in *Lactococcus lactis*. *Antonie van Leeuwenhoek*, 82 (1): 263-269
- Geissman TA (1944)** The Cannizzaro Reaction. In: *Organic Reactions*. Adams R (ed) 2. Auflage, 94-113, John Wiley & Sons, Inc., New York
- Gröger H, Capan E, Barthuber A und Vorlop K-D (2001)** Asymmetric Synthesis of an (R)-Cyanohydrin Using Enzymes Entrapped in Lens-Shaped Gels. *Organic Letters*, 3 (13): 1969-1972
- Grosjean D und Grosjean E (2001)** Identification of airborne carbonyls by LC-APNCl-MS analysis of their DNPH derivatives. *Abstracts of Papers of the American Chemical Society*, 41 (1): 643-645

- Haas T, Klasovsky F, Krauter H, Schaffer S, Schöbel R, Tacke T, Vorlop K-D, Willke T und Wessel M (2010)** Method For The Production by Fermentation Of (3-Hydroxy) Propionaldehyde In The Presence Of Semicarbazide Or Carbohydrazide. Evonik Degussa GmbH, DE [WO/2010/127970 A3]
- Hahn A und Niemer H (1934)** Die Bestimmung der Brenztraubensäure im Muskel. Zeitschrift für Biologie, 95 (2): 169-172
- Hahn-Hägerdal B und Mattiasson B (1982)** Azide sterilization of fermentation media. Applied Microbiology and Biotechnology, 14 (3): 140-143
- Hall RH und Stern ES (1950)** Acid-Catalysed Hydration of Acraldehyde - Kinetics of the Reaction and Isolation of β -Hydroxypropaldehyde. Journal of the Chemical Society, 0 : 490-498
- Hansen EB (2002)** Commercial bacterial starter cultures for fermented foods of the future. International Journal of Food Microbiology, 78 (1-2): 119-131
- Hao J, Wang W, Tian JS, Li JL und Liu DH (2008)** Decrease of 3-hydroxypropionaldehyde accumulation in 1,3-propanediol production by over-expressing *dhaT* gene in *Klebsiella pneumoniae* TUAC01. Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology, 35 (7): 735-741
- Hartmeier W (1986)** Immobilisierte Biokatalysatoren. Springer Verlag, Heidelberg
- Hayat MA (1986)** Glutaraldehyde: Role in electron microscopy. Micron and Microscopica Acta, 17 (2): 115-135
- Hébert EM, Raya RR und Savoy de Giori G (2004)** Evaluation of Minimal Nutritional Requirements of Lactic Acid Bacteria Used in Functional Foods Environmental Microbiology. In: Environmental Microbiology-Methods and Protocols. Walker JM, Spencer JFT und Ragout de Spencer AL (eds) 16. Auflage, 139-148, Humana Press Inc., Totowa
- Henry CS, Broadbelt LJ und Hatzimanikatis V (2010)** Discovery and Analysis of Novel Metabolic Pathways for the Biosynthesis of Industrial Chemicals: 3-Hydroxy-propanoate. Biotechnology and Bioengineering, 106 (3): 462-473
- Herrmann WO und Haehnel W (1927)** Über den Poly-vinylalkohol. Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft, 60 (7): 1658-1663
- Heyns K und Koch H (1970)** Formation of nitrosamines by the reaction of monosaccharides with amino acids (Maillard reaction). Tetrahedron Letters, (10): 741-744
- Higuchi M, Yamamoto Y und Kamio Y (2000)** Molecular biology of oxygen tolerance in lactic acid bacteria: Functions of NADH oxidases and Dpr in oxidative stress. Journal of Bioscience and Bioengineering, 90 (5): 484-493
- Hill EG und Patton AR (1947)** The Maillard Reaction in Microbiological Assay. Science, 105 (2731): 481-482
- Hinman RL (1958)** Base Strengths of Some Alkylhydrazines. Journal of Organic Chemistry, 23 (10): 1587-1588
- Honda S, Toraya T und Fukui S (1980)** Insitu Reactivation of Glycerol-Inactivated Coenzyme-B₁₂-Dependent Enzymes, Glycerol Dehydratase and Diol Dehydratase. Journal of Bacteriology, 143 (3): 1458-1465

- Hopwood D, Callen CR und McCabe M (1970)** The reactions between glutaraldehyde and various proteins. An investigation of their kinetics. *Histochemical Journal*, 2 (2): 137-150
- Humphreys FB (1924)** Formation of Acrolein from Glycerol by *B. welchii*. *Journal of Infectious Diseases*, 35 (3): 282-290
- Jamalifar H, Rahimi H, Samadi N, Shahverdi A, Sharifian Z, Hosseini F, Eslahi H und Fazeli M (2011)** Antimicrobial activity of different *Lactobacillus* species against multi- drug resistant clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *Iranian Journal of Microbiology*, 3 (1): 21-25
- Jekel M, Buhr A, Willke T und Vorlop K-D (1998a)** Immobilization of biocatalysts in LentiKats. *Chemical Engineering & Technology*, 21 (3): 275-278
- Jekel M, Buhr A, Willke T und Vorlop K-D (1998b)** Neuartige Geleinschlußimmobilisate (LentiKats) in der Biotechnologie. *Chemie Ingenieur Technik*, 70 (4): 438-441
- Jensen H, Grimmer S, Naterstad K und Axelsson L (2012)** In vitro testing of commercial and potential probiotic lactic acid bacteria. *International Journal of Food Microbiology*, 153 (1–2): 216-222
- Jiang XL, Meng X und Xian M (2009)** Biosynthetic pathways for 3-hydroxypropionic acid production. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 82 (6): 995-1003
- Jo JE, Mohan Raj S, Rathnasingh C, Selvakumar E, Jung WC und Park S (2008)** Cloning, expression, and characterization of an aldehyde dehydrogenase from *Escherichia coli* K-12 that utilizes 3-Hydroxypropionaldehyde as a substrate. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 81 (1): 51-60
- Johnson BC, Stroinski A und Schneider Z (1975)** Glycerol dehydratase from *Aerobacter aerogenes*. *Methods in Enzymology*, 42: 315-323
- Kajiura H, Mori K, Tobimatsu T und Toraya T (2001)** Characterization and mechanism of action of a reactivating factor for adenosylcobalamin-dependent glycerol dehydratase. *Journal of Biological Chemistry*, 276 (39): 36514-36519
- Kajiura H, Mori K, Shibata N und Toraya T (2007)** Molecular basis for specificities of reactivating factors for adenosylcobalamin-dependent diol and glycerol dehydratases. *FEBS Journal*, 274 (21): 5556-5566
- Kandler O und Stetter K (1973)** Der Beitrag neuerer biochemischer Merkmale für die Systematik der Laktobazillen. In: 3. Symposium Technische Mikrobiologie., 501-506, Verlag Versuchs- und Lehranstalt für Spiritusfabrikation u. Fermentationstechnologie im Institut für Gärungsgewerbe u. Biotechnologie, Berlin
- Kandler O, Stetter KO und Kohl R (1980)** *Lactobacillus reuteri* sp. nov., a New Species of Heterofermentative Lactobacilli. *Zentralblatt für Bakteriologie Mikrobiologie und Hygiene: I Abt Originale C: Allgemeine, angewandte und ökologische Mikrobiologie*, 1 (3): 264-269
- Kato N, Shirakawa K, Kobayashi H und Sakazawa C (1983)** The Dismutation of Aldehydes by A Bacterial Enzyme. *Agricultural and Biological Chemistry*, 47 (1): 39-46
- Kawahara Ji, Ohmori T, Ohkubo T, Hattori S und Kawamura M (1992)** The structure of glutaraldehyde in aqueous solution determined by ultraviolet absorption and light scattering. *Analytical Biochemistry*, 201 (1): 94-98

- Kawahara Ji, Ishikawa K, Uchimaru T und Takaya N (1997)** Chemical cross-linking by glutaraldehyde between amino groups: its mechanism and effects. In: Polymer modification. Swift G, Carraher CE und Bowman CN (eds), 119-131, Plenum Press, New York
- Keller MK, Bardow A, Jensdottir T, Lykkeaa J und Twetman S (2012)** Effect of chewing gums containing the probiotic bacterium *Lactobacillus reuteri* on oral malodour. Acta Odontologica Scandinavica, 70 (3): 246-250
- Kerwar SS, Smith TA und Abeles RH (1970)** The Coenzymic and Chemical Properties of a Carbocyclic Analogue of Vitamin B₁₂ Coenzyme. Journal of Biological Chemistry, 245 (5): 1169-1174
- Klein J und Vorlop K-D (1985)** Immobilization techniques - Cells. In: Comprehensive Biotechnology. Moo-Young M (ed), 203-224, Pergamon Press, Oxford
- Klibanov AM (1983)** Immobilized enzymes and cells as practical catalysts. Science, 219 (4585): 722-727
- Korn AH, Fairheller SH und Filachoine EM (1972)** Glutaraldehyde: Nature of the reagent. Journal of Molecular Biology, 65 (3): 525-529
- Krauter H, Willke T und Vorlop K-D (2012)** Production of high amounts of 3-hydroxypropionaldehyde from glycerol by *Lactobacillus reuteri* with strongly increased biocatalyst lifetime and productivity. New Biotechnology, 29 (2): 211-217
- Kuleasan H und Cakmakci ML (2002)** Effect of reuterin produced by *Lactobacillus reuteri* on the surface of sausages to inhibit the growth of *Listeria monocytogenes* and *Salmonella spp.* Nahrung-Food, 46 (6): 408-410
- Kurzer F und Wilkinson M (1970)** Chemistry of Carbohydrazide and Thiocarbohydrazide. Chemical Reviews, 70 (1): 111-149
- Kuznetsova OG, Zytner YD und Makarov KA (1992)** Electrochemical Degradation of Polyvinyl-Alcohol. Journal of Applied Chemistry of the Ussr, 65 (11): 2067-2070
- Larking DM, Crawford RJ, Christie GBY und Lonergan GT (1999)** Enhanced Degradation of Polyvinyl Alcohol by *Pycnoporus cinnabarinus* after Pretreatment with Fenton's Reagent. Applied and Environmental Microbiology, 65 (4): 1798-1800
- Lee HA und Abeles RH (1963)** Purification and Properties of Dioldehydrase, An Enzyme Requiring A Cobamide Coenzyme. Journal of Biological Chemistry, 238 (7): 2367-2373
- Lee SO, Hong GW und Oh DK (2003)** Bioconversion of Linoleic Acid into Conjugated Linoleic Acid by Immobilized *Lactobacillus reuteri*. Biotechnology Progress, 19 (3): 1081-1084
- Lehotay J und Hromulakova K (1994)** HPLC Determination of Trace Levels of Aliphatic-Aldehydes C₁ - C₄ in River and Tap Water Using Online Preconcentration. Journal of Liquid Chromatography, 17 (3): 579-588
- Lerche M und Reuter G (1962)** Das Vorkommen aerob wachsender gram-positiver Stäbchen des Genus *Lactobacillus* Beijerinck im Darminhalt erwachsener Menschen. (Gleichzeitig ein Beitrag zur genaueren Kenntnis der aeroben Laktobazillen). Zentralblatt für Bakteriologie, Parasitenkunde, Infektionskrankheiten und Hygiene 1 Abteilung Medizinisch-Hygienische Bakteriologie, Virusforschung und Parasitologie Originale, 185 (4): 446-481
- Leuba JL und Widmer F (1979)** Immobilization of proteinases on Chitosan. Biotechnology Letters, 1 (3): 109-114

- Liang HF, Chen CN, Chang Y und Sung HW (2003)** Natural antimicrobial agent (reuterin) produced by *Lactobacillus reuteri* for sanitization of biological tissues inoculated with *Pseudomonas aeruginosa*. *Biotechnology and Bioengineering*, 84 (2): 233-239
- Lin ECC (1976)** Glycerol Dissimilation and Its Regulation in Bacteria. *Annual Review of Microbiology*, 30: 535-578
- Lindgren SE, Swaisgood HE, Janolino VG, Axelsson LT, Richter CS, Mackenzie JM und Dobrogosz WJ (1992)** Binding of *Lactobacillus reuteri* to fibronectin immobilized on glass beads. *Zentralblatt für Bakteriologie*, 277 (4): 519-528
- Lorca G, Torino MI, Font de Valdez G und Ljungh Å (2002)** Lactobacilli express cell surface proteins which mediate binding of immobilized collagen and fibronectin. *FEMS Microbiology Letters*, 206 (1): 31-37
- Lozinsky VI, Vainerman ES, Domotenko LV, Mamtsis AM, Titova EF, Belavtseva EM und Rogozhin SV (1986)** Study of cryostructurization of polymer systems VII. Structure formation under freezing of poly(vinyl alcohol) aqueous solutions. *Colloid & Polymer Science*, 264 (1): 19-24
- Lubig R, Kusch P, Röper K und Zahn H (1981)** Zum Reaktionsmechanismus von Glutaraldehyd mit Proteinen. *Monatshefte für Chemie-Chemical Monthly*, 112 (11): 1313-1323
- Luo LH, Seo JW, Baek JO, Oh BR, Heo SY, Hong WK, Kim DH und Kim CH (2011)** Identification and characterization of the propanediol utilization protein PduP of *Lactobacillus reuteri* for 3-hydroxypropionic acid production from glycerol. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 89 (3): 697-703
- Lüthi-Peng Q, Scharer S und Puhán Z (2002a)** Production and stability of 3-hydroxypropionaldehyde in *Lactobacillus reuteri*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 60 (1-2): 73-80
- Lüthi-Peng Q, Dileme FB und Puhán Z (2002b)** Effect of glucose on glycerol bioconversion by *Lactobacillus reuteri*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 59 (2/3): 289-296
- Macis L, Daniel R und Gottschalk G (1998)** Properties and sequence of the coenzyme B₁₂-dependent glycerol dehydratase of *Clostridium pasteurianum*. *FEMS Microbiology Letters*, 164 (1): 21-28
- Maillard LC (1912)** Action des acides aminés sur les sucres: formation des mélanoidines par voie méthodique. *Comptes rendus de l'Académie des sciences La vie des sciences*, 154: 66-68
- Maioresella BL, Blanch HW und Wilke CR (1984)** Economic evaluation of alternative ethanol fermentation processes. *Biotechnology and Bioengineering*, 26 (9): 1003-1025
- Makarova K und andere (2006)** Comparative genomics of the lactic acid bacteria. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103 (42): 15611-15616
- Martens J-H, Barg H, Warren M und Jahn D (2002)** Microbial production of vitamin B₁₂. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 58 (3): 275-285
- Mateo C, Palomo JM, Fernandez-Lorente G, Guisan JM und Fernandez-Lafuente R (2007)** Improvement of enzyme activity, stability and selectivity via immobilization techniques. *Enzyme and Microbial Technology*, 40 (6): 1451-1463

- Mattiasson B (1983)** Immobilisation methods. In: Immobilized cells and organelles. CRC Press, Boca Raton
- Meier HJ und Ullrich V (1995)** Additionen von N-Nukleophilen. In: Grundlagen der Organischen Chemie für Biowissenschaften., 312-321, Gustav Fischer, Stuttgart-Jena-New York
- Mickelson MN und Werkman CH (1940)** The Dissimilation of Glycerol by *Coli-Aerogenes* Intermediates. *Journal of Bacteriology*, 39 (6): 709-715
- Migneault I, Dartiguenave C, Bertrand MJ und Waldron KC (2004)** Glutaraldehyde: behavior in aqueous solution, reaction with proteins, and application to enzyme crosslinking. *Biotechniques*, 37 (5): 790-802
- Mills DE, Baugh WD und Conner HA (1954)** Studies on the formation of acrolein in distillery mashes. *Journal of Applied Microbiology*, 2 (1): 9-13
- Mohamadi Sani A, Ehsani MR und Mazaheri Assadi M (2005)** Application of Reuterin Produced by *Lactobacillus reuteri* DSM 20016 to Inhibit Some Food-born Pathogens in UF-Feta-Cheese. 9th International Conference on Agricultural Biotechnology: Ten Years After, Ravello (Italien),
- Mohan Raj S, Rathnasingh C, Jung WC und Park S (2009)** Effect of process parameters on 3-hydroxypropionic acid production from glycerol using a recombinant *Escherichia coli*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 84 (4): 649-657
- Mori K, Tobimatsu T und Toraya T (1997a)** A protein factor is essential for in situ reactivation of glycerol-inactivated adenosylcobalamin-dependent diol dehydratase. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*, 61 (10): 1729-1733
- Mori K, Tobimatsu T, Hara T und Toraya T (1997b)** Characterization, sequencing, and expression of the genes encoding a reactivating factor for glycerol-inactivated adenosylcobalamin-dependent diol dehydratase. *Journal of Biological Chemistry*, 272 (51): 32034-32041
- Morita H, Toh H, Fukuda S, Horikawa H, Oshima K, Suzuki T, Murakami M, Hisamatsu S, Kato Y, Takizawa T, Fukuoka H, Yoshimura T, Itoh K, O'Sullivan DJ, McKay LL, Ohno H, Kikuchi J, Masaoka T und Hattori M (2008)** Comparative genome analysis of *Lactobacillus reuteri* and *Lactobacillus fermentum* reveal a genomic island for reuterin and cobalamin production. *DNA Research*, 15 (3): 151-161
- Muzny D und andere (2011)** CoA-dependent propionaldehyde dehydrogenase. Datenbank: UniProtKB/TrEMBL, Zugangsnummer: E9RR10.
<http://www.uniprot.org/uniprot/E9RR10>, Zugriff 10.09.2012
- Nakas JP, Schaedle M, Parkinson CM, Coonley CE und Tanenbaum SW (1983)** System development for linked-fermentation production of solvents from algal biomass. *Applied and Environmental Microbiology*, 46 (5): 1017-1023
- Neumann, A. (1993).** Untersuchung zur anaeroben Dechlorierung von Tetrachlorethen in *Dehallospirillum multivorans* spec. nov. Diplomarbeit, Stuttgart
- Northern Piedmont Section (1980)** Carbohydrazide found to be an effective scavenger for reducing free formaldehyde. Intersectional Technical Paper Competition,
- O'Brien JR, Raynaud C, Croux C, Girbal L, Soucaille P und Lanzilotta WN (2004)** Insight into the mechanism of the B₁₂-independent glycerol dehydratase from *Clostridium butyricum*: Preliminary biochemical and structural characterization. *Biochemistry*, 43 (16): 4635-4645

- Ohta T, Ogbonna J, Tanaka H und Yajima M (1994)** Development of a fermentation method using immobilized cells under unsterile conditions. 2. Ethanol and L-lactic acid production without heat and filter sterilization. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 42 (2): 246-250
- Okuda K, Urabe I, Yamada Y und Okada H (1991)** Reaction of glutaraldehyde with amino and thiol compounds. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 71 (2): 100-105
- Ortiz M, Fornaguera M, Raya R und Mozzi F (2012)** *Lactobacillus reuteri* CRL 1101 highly produces mannitol from sugarcane molasses as carbon source. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 95 (4): 991-999
- Pasteris SE und Strasser de Saad AM (2009)** Sugar-Glycerol Cofermentations by *Lactobacillus hilgardii* Isolated from Wine. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57 (9): 3853-3858
- Pasteur L (1866)** Études sur le vin, ses maladies, causes qui les provoquent, procédés nouveaux pour le conserver et pour le vieillir. Imprimerie impériale, Paris
- Pinto MG, Pasteris SE und de Saad AMS (2004)** Glycerol catabolism by *Pediococcus pentosaceus* isolated from beer. *Food Microbiology*, 21 (1): 111-118
- Powell JB, Pledger WR, Matzakos AN, Weider PR und Arhancet JP (1996)** Process for preparation of 1,3-propanediol via hydrogenation of 3-hydroxypropanal. Shell Oil Co., US [US 5,786,524]
- Poznanskaya AA, Yakusheva MI und Yakovlev VA (1977)** Study of the mechanism of action of adenosylcobalamin-dependent glycerol dehydratase from *Aerobacter aerogenes*. II. The inactivation kinetics of glycerol dehydratase complexes with adenosylcobalamin and its analogs. *Biochimica et Biophysica Acta*, 484 (1): 236-243
- Pressman D und Lucas HJ (1942)** Hydration of Unsaturated Compounds. XI. Acrolein and Acrylic Acid. *Journal of the American Chemical Society*, 64 (8): 1953-1957
- Prüße U, Bruske F, Breford J und Vorlop K-D (1998a)** Improvements to the jet cutting process for manufacturing spherical particles from viscous polymer solutions. *Chemie Ingenieur Technik*, 70 (5): 556-560
- Prüße U, Fox B, Kirchhoff M, Bruske F, Breford J und Vorlop K-D (1998b)** New process (jet cutting method) for the production of spherical beads from highly viscous polymer solutions. *Chemical Engineering & Technology*, 21 (1): 29-33
- Qi XH, Sun L, Luo ZF, Wu JQ, Meng XL, Tang Y, Wei YT und Huang RB (2006)** Rational design of glycerol dehydratase: Swapping the genes encoding the subunits of glycerol dehydratase to improve enzymatic properties. *Chinese Science Bulletin*, 51 (24): 2977-2985
- Qi X, Chen Y, Jiang K, Zuo W, Luo Z, Wei Y, Du L, Wei H, Huang R und Du Q (2009)** Saturation-mutagenesis in two positions distant from active site of a *Klebsiella pneumoniae* glycerol dehydratase identifies some highly active mutants. *Journal of Biotechnology*, 144 (1): 43-50
- Quiocho FA und Richards FM (1964)** Intermolecular cross linking of a protein in the crystalline state: carboxypeptidase-A. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 52 (3): 833-839
- Raj SM, Rathnasingh C, Jo JE und Park S (2008)** Production of 3-hydroxypropionic acid from glycerol by a novel recombinant *Escherichia coli* BL21 strain. *Process Biochemistry*, 43 (12): 1440-1446

- Rasch M (2002)** The influence of temperature, salt and pH on the inhibitory effect of reuterin on *Escherichia coli*. International Journal of Food Microbiology, 72 (3): 225-231
- Rasch M, Barker GC, Sachau K, Jakobsen M und Arneborg N (2002)** Characterisation and modelling of oscillatory behaviour related to reuterin production by *Lactobacillus reuteri*. International Journal of Food Microbiology, 73 (2-3): 383-394
- Rasch M, Metris A, Baranyi J und Budde BB (2007)** The effect of reuterin on the lag time of single cells of *Listeria innocua* grown on a solid agar surface at different pH and NaCl concentrations. International Journal of Food Microbiology, 113 (1): 35-40
- Reuter G (2001)** The Lactobacillus and Bifidobacterium microflora of the human intestine: composition and succession. Curr Issues Intest Microbiol, 2 (2): 43-53
- Reynolds H, Hoehn WM und Werkman CH (1939)** Occurrence of acrolein as an intermediate during the fermentation of glycerol by the coli-aerogenes bacteria. Iowa State College Journal of Science, 13: 275-277
- Richards FM und Knowles JR (1968)** Glutaraldehyde as a protein cross-linking reagent. Journal of Molecular Biology, 37 (1): 231-233
- Richardson SD, Caughran TV, Poiger T, Guo Y und Crumley FG (2000)** Application of DNPH Derivatization with LC/MS to the Identification of Polar Carbonyl Disinfection Byproducts in Drinking Water. Ozone-Science & Engineering, 22 (6): 653-675
- Rodríguez C, Rimaux T, Fornaguera M, Vrancken G, de Valdez G, de Vuyst L und Mozzi F (2012)** Mannitol production by heterofermentative *Lactobacillus reuteri* CRL 1101 and *Lactobacillus fermentum* CRL 573 in free and controlled pH batch fermentations. Applied Microbiology and Biotechnology, 93 (6): 2519-2527
- Roos S und Jonsson H (2002)** A high-molecular-mass cell-surface protein from *Lactobacillus reuteri* 1063 adheres to mucus components. Microbiology, 148 (2): 433-442
- Rosevear A (1984)** Immobilised biocatalysts - a critical review. Journal of Chemical Technology & Biotechnology, 34 (3): 127-150
- Roth JR, Lawrence JG und Bobik TA (1996)** COBALAMIN (COENZYME B₁₂): Synthesis and Biological Significance. Annual Review of Microbiology, 50 (1): 137-181
- Rütti DP, Vollenweider S, Mauler X, Jeremiç T, Mathis M, Díe A und Lacroix C (2007)** Biotechnological production of 3-hydroxypropionaldehyde combined with an in situ product removal process to purify this compound. Journal of Biotechnology, 131 (2): 192-193
- Rütti DP (2010)** Biotechnological production of antimicrobial 3-Hydroxypropionaldehyde from glycerol using free and immobilised *Lactobacillus reuteri* cells and its reactive extraction. Dissertation, Zürich
- Rütti DP, Lacroix C, Jeremiç T, Mathis M, Díe A und Vollenweider S (2011)** Development of a reversible binding process for in situ removal of 3-hydroxypropionaldehyde during biotechnological conversion of glycerol. Biochemical Engineering Journal, 55 (3): 176-184
- Sampson EM und Bobik TA (2008)** Microcompartments for B₁₂-Dependent 1,2-Propanediol Degradation Provide Protection from DNA and Cellular Damage by a Reactive Metabolic Intermediate. Journal of Bacteriology, 190 (8): 2966-2971

- Santos F, Vera JL, Lamosa P, de Valdez GF, de Vos WM, Santos H, Sesma F und Hugenholtz J (2007)** Pseudovitamin B₁₂ is the corrinoid produced by *Lactobacillus reuteri* CRL1098 under anaerobic conditions. *FEBS Letters*, 581 (25): 4865-4870
- Santos F, Vera JL, van der Heijden R, Valdez G, de Vos WM, Sesma F und Hugenholtz J (2008)** The complete coenzyme B₁₂ biosynthesis gene cluster of *Lactobacillus reuteri* CRL1098. *Microbiology*, 154 (1): 81-93
- Santos F, Spinler J, Saulnier D, Molenaar D, Teusink B, de Vos W, Versalovic J und Hugenholtz J (2011)** Functional identification in *Lactobacillus reuteri* of a PocR-like transcription factor regulating glycerol utilization and vitamin B₁₂ synthesis. *Microbial Cell Factories*, 10 (1): 55
- Sauvageot N, Gouffi K, Laplace JM und Auffray Y (2000)** Glycerol metabolism in *Lactobacillus collinoides*: production of 3-hydroxypropionaldehyde, a precursor of acrolein. *International Journal of Food Microbiology*, 55 (1-3): 167-170
- Saxena RK, Anand P, Saran S und Isar J (2009)** Microbial production of 1,3-propanediol: Recent developments and emerging opportunities. *Biotechnology Advances*, 27 (6): 895-913
- Schäfer L, Auchtung TA, Hermans KE, Whitehead D, Borhan B und Britton RA (2010)** The antimicrobial compound reuterin (3-hydroxypropionaldehyde) induces oxidative stress via interaction with thiol groups. *Microbiology*, 156 (6): 1589-1599
- Schaffer S, Wessel M und Haas T (2008)** Mikrobiologische Herstellung von Aldehyden, insbesondere von 3-Hydroxypropionaldehyd. Evonik Degussa GmbH, DE [DE 102007027006 A1]
- Schauenstein E, Esterbauer H und Zollner H (1977)** Aldehydes in biological systems: their natural occurrence and biological activities. Pion, London
- Schlegel HG (1992)** Milchsäuregärung und *Lactobacteriaceae*. In: Allgemeine Mikrobiologie. Zaborosch C (ed) 7. Auflage, 296-304, Georg Thieme Verlag, Stuttgart · New York
- Schleifer KH und Ludwig W (1995)** Phylogeny of the Genus *Lactobacillus* and Related Genera. *Systematic and Applied Microbiology*, 18 (4): 461-467
- Schlieker M und Vorlop K-D (2006)** A Novel Immobilization Method for Entrapment: LentiKats®. In: Immobilization of Enzymes and Cells. Guisan JM (ed) 22. Auflage, 333-343, Humana Press Inc., Totowa
- Schneider Z und Pawelkiewicz J (1966)** Properties of Glycerol Dehydratase Isolated from *Aerobacter aerogenes* and Properties of Apoenzyme Subunits. *Acta Biochimica Polonica*, 13 (4): 311-328
- Schneider Z, Larsen EG, Jacobson G, Johnson BC und Pawelkie J (1970)** Purification and Properties of Glycerol Dehydrase. *Journal of Biological Chemistry*, 245 (13): 3388-3396
- Schonberger H, Baumann A und Keller W (1997)** Study of microbial degradation of polyvinylalcohol (PVA) in wastewater treatment plants. *American Dyestuff Reporter*, 86 (8): 9-18
- Schütz H und Radler F (1984)** Anaerobic Reduction of Glycerol to Propanediol-1.3 by *Lactobacillus brevis* and *Lactobacillus buchneri*. *Systematic and Applied Microbiology*, 5 (2): 169-178

- Seifert C, Bowien S, Gottschalk G und Daniel R (2001)** Identification and expression of the genes and purification and characterization of the gene products involved in reactivation of coenzyme B₁₂-dependent glycerol dehydratase of *Citrobacter freundii*. European Journal of Biochemistry, 268 (8): 2369-2378
- Serjak WC, Day WH, van Lanen JM und Boruff CS (1954)** Acrolein production by bacteria found in distillery grain mash. Journal of Applied Microbiology, 2 (1): 14-20
- Seyfried M, Lyon D, Rainey FA und Wiegel J (2002)** *Caloramator viterbensis* sp nov., a novel thermophilic, glycerol-fermenting bacterium isolated from a hot spring in Italy. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 52: 1177-1184
- Slininger PJ, Bothast RJ und Smiley KL (1983)** Production of 3-Hydroxypropionaldehyde from Glycerol. Applied and Environmental Microbiology, 46 (1): 62-67
- Slininger PJ und Bothast RJ (1985)** Optimizing aerobic conversion of glycerol to 3-Hydroxypropionaldehyde. Applied and Environmental Microbiology, 50 (6): 1444-1450
- Slininger PJ, Vancauwenberge JE und Bothast RJ (1990)** Production of 3-Hydroxypropionaldehyde from Glycerol by *Klebsiella pneumoniae*. The United States of America as represented by the Secretary of Agriculture, US [US 4,962,027]
- Slovinsky M (1981)** Boiler additives for oxygen scavenging. Nalco Chemical Company, US [US 4,269,717]
- Smiley KL und Sobolov M (1962)** A Cobamide-Requiring Glycerol Dehydrase from An Acrolein-Forming Lactobacillus. Archives of Biochemistry and Biophysics, 97 (3): 538-543
- Sobolov M und Smiley KL (1960)** Metabolism of glycerol by an acrolein-forming Lactobacillus. Journal of Bacteriology, 79 (2): 261-266
- Sriramulu DD, Liang M, Hernandez-Romero D, Raux-Deery E, Lünsdorf H, Parsons JB, Warren MJ und Prentice MB (2008)** *Lactobacillus reuteri* DSM 20016 Produces Cobalamin-Dependent Diol Dehydratase in Metabolosomes and Metabolizes 1,2-Propanediol by Disproportionation. Journal of Bacteriology, 190 (13): 4559-4567
- Staudinger H, Frey K und Starck W (1927)** Hochmolekulare Verbindungen, 9. Mitteilung: Über Poly-vinylacetat und Poly-vinylalkohol. Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft, 60 (8): 1782-1792
- Stenhouse J (1854)** Ueber die entfärbenden und desinficirenden Eigenschaften der Holzkohle, nebst Beschreibung eines Kohle-Respirators zur Reinigung der Luft durch Filtration. Annalen der Chemie und Pharmacie, 90 (2): 186-190
- Stevens MJ, Vollenweider S, Meile L und Lacroix C (2011)** 1,3-Propanediol dehydrogenases in *Lactobacillus reuteri*: impact on central metabolism and 3-hydroxypropionaldehyde production. Microbial Cell Factories, 10: 61
- Steverding D (2010)** Mikrobielle Herstellung von 1,3-Propandiol. Fermentative Biotechnologie. Chemie in unserer Zeit, 44 (6): 384-389
- Streekstra H, Teixeira de Mattos MJ, Neijssel OM und Tempest DW (1987)** Overflow metabolism during anaerobic growth of *Klebsiella aerogenes* NCTC 418 on glycerol and dihydroxyacetone in chemostat culture. Archives of Microbiology, 147 (3): 268-275
- Stroinski A, Pawelkiewicz J und Johnson BC (1974)** Allosteric interactions in glycerol dehydratase. Purification of enzyme and effects of positive and negative cooperativity for glycerol. Archives of Biochemistry and Biophysics, 162 (2): 321-330

- Sung HW, Chen CN, Chang Y und Liang HF (2002)** Biocompatibility study of biological tissues fixed by a natural compound (reuterin) produced by *Lactobacillus reuteri*. *Biomaterials*, 23 (15): 3203-3214
- Sung HW, Chen CN, Liang HF und Hong MH (2003)** A natural compound (reuterin) produced by *Lactobacillus reuteri* for biological-tissue fixation. *Biomaterials*, 24 (8): 1335-1347
- Suthers PF und Cameron DC (2005)** Production of 3-hydroxypropionic acid in recombinant organisms. Wisconsin Alumni Research Foundation, US [US 6,852,517 B1]
- Svensson S, Lundsjo A, Cronholm T und Hoog JO (1996)** Aldehyde dismutase activity of human liver alcohol dehydrogenase. *FEBS Letters*, 394 (2): 217-220
- Taga ME und Walker GC (2008)** Pseudo-B₁₂ Joins the Cofactor Family. *Journal of Bacteriology*, 190 (4): 1157-1159
- Talarico TL, Casas IA, Chung TC und Dobrogosz WJ (1988)** Production and isolation of reuterin, a growth inhibitor produced by *Lactobacillus reuteri*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 32 (12): 1854-1858
- Talarico TL und Dobrogosz WJ (1989)** Chemical characterization of an antimicrobial substance produced by *Lactobacillus reuteri*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 33 (5): 674-679
- Talarico TL und Dobrogosz WJ (1990)** Purification and Characterization of Glycerol Dehydratase from *Lactobacillus reuteri*. *Applied and Environmental Microbiology*, 56 (4): 1195-1197
- Talarico TL, Axelsson LT, Novotny J, Fiuzat M und Dobrogosz WJ (1990)** Utilization of Glycerol as a Hydrogen Acceptor by *Lactobacillus reuteri*: Purification of 1,3-Propanediol:NAD⁺ Oxidoreductase. *Applied and Environmental Microbiology*, 56 (4): 943-948
- Tang XM, Tan YS, Zhu H, Zhao K und Shen W (2009)** Microbial Conversion of Glycerol to 1,3-Propanediol by an Engineered Strain of *Escherichia coli*. *Applied and Environmental Microbiology*, 75 (6): 1628-1634
- Tobajas M, Mohedano AF, Casas JA und Rodriguez JJ (2007)** A kinetic study of reuterin production by *Lactobacillus reuteri* PRO 137 in resting cells. *Biochemical Engineering Journal*, 35 (2): 218-225
- Tobajas M, Mohedano AF, Casas JA und Rodriguez JJ (2008)** Unstructured kinetic model for reuterin and 1,3-propanediol production by *Lactobacillus reuteri* from glycerol/glucose cofermentation. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, 84 (5): 675-680
- Tobimatsu T, Kajiura H, Yunoki M, Azuma M und Toraya T (1999)** Identification and expression of the genes encoding a reactivating factor for adenosylcobalamin-dependent glycerol dehydratase. *Journal of Bacteriology*, 181 (13): 4110-4113
- Tobimatsu T, Kajiura H und Toraya T (2000)** Specificities of reactivating factors for adenosylcobalamin-dependent diol dehydratase and glycerol dehydratase. *Archives of Microbiology*, 174 (1-2): 81-88
- Toraya T, Sugimoto Y, Tamao Y, Shimizu S und Fukui S (1971)** Propanediol Dehydratase System Role of Monovalent Cations in Binding of Vitamin-B₁₂ Coenzyme Or Its Analogs to Apoenzyme. *Biochemistry*, 10 (18): 3475-3484

- Toraya T und Fukui S (1977)** Immunochemical evidence for the difference between coenzyme-B₁₂-dependent diol dehydratase and glycerol dehydratase. *European Journal of Biochemistry*, 76 (1): 285-289
- Toraya T, Ushio K, Fukui S und Hogenkamp HPC (1977)** Studies on Mechanism of Adenosylcobalamin-Dependent Diol Dehydrase Reaction by Use of Analogs of Coenzyme. *Journal of Biological Chemistry*, 252 (3): 963-970
- Toraya T, Kuno S und Fukui S (1980)** Distribution of coenzyme B₁₂-dependent diol dehydratase and glycerol dehydratase in selected genera of *Enterobacteriaceae* and *Propionibacteriaceae*. *Journal of Bacteriology*, 141 (3): 1439-1442
- Toraya T und Fukui S (1982)** Diol Dehydratase. In: B₁₂. Dolphin D (ed), 233-262, John Wiley & Sons, Inc., New York
- Toraya T und Mori K (1999)** A reactivating factor for coenzyme B₁₂-dependent diol dehydratase. *Journal of Biological Chemistry*, 274 (6): 3372-3377
- Toraya T (2000)** Radical catalysis of B₁₂ enzymes: structure, mechanism, inactivation, and reactivation of diol and glycerol dehydratases. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 57 (1): 106-127
- Toraya T (2003)** Radical catalysis in coenzyme B₁₂-dependent isomerization (eliminating) reactions. *Chemical Reviews*, 103 (6): 2095-2127
- Toraya T, Honda S und Mori K (2010)** Coenzyme B₁₂-Dependent Diol Dehydratase Is a Potassium Ion-Requiring Calcium Metalloenzyme: Evidence That the Substrate-Coordinated Metal Ion Is Calcium. *Biochemistry*, 49 (33): 7210-7217
- Toraya T, Honda S und Fukui S (1979)** Fermentation of 1,2-Propanediol and 1,2-Ethanediol by Some Genera of *Enterobacteriaceae*, Involving Coenzyme B₁₂-Dependent Diol Dehydratase. *Journal of Bacteriology*, 139 (1): 39-47
- Tsen J-H, Huang H-Y, Lin Y-P und King VA-E (2007)** Freezing resistance improvement of *Lactobacillus reuteri* by using cell immobilization. *Journal of Microbiological Methods*, 70 (3): 561-564
- Uebori M und Imamura K (2004)** Analysis of aliphatic and aromatic carbonyl compounds in ambient air by LC/MS/MS. *Analytical Sciences*, 20 (10): 1459-1462
- Ulmer C und Zeng A-P (2007)** Microbial production of 3-Hydroxypropionaldehyde from glycerol bioconversion. *Chemical and Biochemical Engineering Quarterly*, 21 (4): 321-326
- Ulmer C (2008)** Mikrobielle Produktion von 3-Hydroxypropionaldehyd. Prozessentwicklung, Optimierung und Aufarbeitung. Dissertation, Braunschweig
- van der Kaaij H, Desiere F, Mollet B und Germond JE (2004)** L-Alanine Auxotrophy of *Lactobacillus johnsonii* as Demonstrated by Physiological, Genomic, and Gene Complementation Approaches. *Applied and Environmental Microbiology*, 70 (3): 1869-1873
- Vancauwenberge JE, Slininger PJ und Bothast RJ (1990)** Bacterial conversion of glycerol to beta-hydroxypropionaldehyde. *Applied and Environmental Microbiology*, 56 (2): 329-332
- Veiga-Da-Cunha M und Foster MA (1992)** Sugar Glycerol Cofermentations in Lactobacilli the Fate of Lactate. *Journal of Bacteriology*, 174 (3): 1013-1019

- Vogel R, Pavlovic M, Ehrmann M, Wiezer A, Liesegang H, Offschanka S, Voget S, Angelov A, Bocker G und Liebl W (2011)** Genomic analysis reveals *Lactobacillus sanfranciscensis* as stable element in traditional sourdoughs. *Microbial Cell Factories*, 10 (Suppl 1): S6
- Voisenet ME (1910)** Formation d'acroléine dans la maladie de l'amertume des vins. *Comptes rendus hebdomadaires des séances de l'Académie des sciences*, 150: 1614-1616
- Voisenet ME und Gautier MA (1910)** Nouvelles recherches sur les vins amers et la fermentation acrylique de la glycérine. *Comptes rendus hebdomadaires des séances de l'Académie des sciences*, 151: 518-520
- Voisenet ME (1914)** Sur un ferment contenu dans les eaux, agent de déshydratation de la glycérine. *Annales de l'Institut Pasteur*, 28: 807-818
- Voisenet ME und Gautier MA (1914a)** Nouvelles recherches sur un ferment, contenu dans les eaux, agent de déshydratation de la glycérine. *Comptes rendus hebdomadaires des séances de l'Académie des sciences*, 158: 734-736
- Voisenet ME und Gautier MA (1914b)** Sur un ferment contenu dans les eaux, agent de déshydratation de la glycérine. *Comptes rendus hebdomadaires des séances de l'Académie des sciences*, 158: 195-197
- Vollenweider S, Grassi G, König I und Puhán Z (2003)** Purification and structural characterization of 3-hydroxypropionaldehyde and its derivatives. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51 (11): 3287-3293
- Vollenweider S und Lacroix C (2004)** 3-Hydroxypropionaldehyde: applications and perspectives of biotechnological production. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 64 (1): 16-27
- Vollenweider S, Evers S, Zurbriggen K und Lacroix C (2010)** Unraveling the Hydroxypropionaldehyde (HPA) System: An Active Antimicrobial Agent against Human Pathogens. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58 (19): 10315-10322
- von Weymarn N (2002)** Process development for mannitol production by lactic acid Bacteria. Dissertation, Helsinki
- Vorlop K-D und Remmers P (1991)** Verfahren zur Herstellung von Biokatalysatoren. [DE 4027218 C1]
- Vorlop K-D und Remmers P (1992)** Verfahren zur Herstellung von Biokatalysatoren. [EP 478097 A1]
- Vorlop K-D und Ding WA (1997)** Gel aus Polyvinylalkohol und Verfahren zu seiner Herstellung. Arbo Medizin-Technologie GmbH, DE [DE 4327923 C2]
- Vorlop K-D und Jekel M (2000)** Verfahren zur Herstellung eines Gels aus Polyvinylalkohol und nach dem Verfahren hergestelltes mechanisch hochstabiles Gel. [DE 19827552 C1]
- Wagner OW, Lee HA, Frey PA und Abeles RH (1966)** Studies on Mechanism of Action of Cobamide Coenzymes - Chemical Properties of Enzyme-Coenzyme Complex. *Journal of Biological Chemistry*, 241 (8): 1751-1762
- Walt DR und Agayn VI (1994)** The Chemistry of Enzyme and Protein Immobilization with Glutaraldehyde. *Trends in Analytical Chemistry*, 13 (10): 425-430
- Wang F, Qu H, Tian P und Tan T (2007)** Heterologous expression and characterization of recombinant glycerol dehydratase from *Klebsiella pneumoniae* in *Escherichia coli*. *Biotechnology Journal*, 2 (6): 736-742

- Wanke M und Szajewska H (2012)** Lack of an Effect of *Lactobacillus reuteri* DSM 17938 in Preventing Nosocomial Diarrhea in Children: A Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Trial. *The Journal of Pediatrics*, 161 (1): 40-43
- Willke T und Vorlop K-D (2004)** Industrial bioconversion of renewable resources as an alternative to conventional chemistry. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 66 (2): 131-142
- Willke T und Vorlop K-D (2008)** Biotransformation of glycerol into 1,3-propanediol. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 110 (9): 831-840
- Wittlich P (2001)** Biotechnische Herstellung von 1,3-Propandiol aus Glycerin mit immobilisierten Zellen von *Clostridium butyricum* NRRL B-1024 und thermophilen Mikroorganismen. Dissertation, Braunschweig
- Wittlich P, Capan E, Schlieker M, Vorlop K-D und Jahnz U (2004)** Entrapment in LentiKats®. In: *Fundamentals of cell immobilisation biotechnology*. Nedovic V und Willaert R (eds), 53-63, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht · Boston · London
- Xu Xi, Zhang Gl, Wang Lw, Ma Bb und Li C (2009)** Quantitative analysis on inactivation and reactivation of recombinant glycerol dehydratase from *Klebsiella pneumoniae* XJPD-Li. *Journal of Molecular Catalysis B-Enzymatic*, 56 (2-3): 108-114
- Yamanishi M, Yunoki M, Tobimatsu T, Sato H, Matsui J, Dokiya A, Iuchi Y, Oe K, Suto K, Shibata N, Morimoto Y, Yasuoka N und Toraya T (2002)** The crystal structure of coenzyme B₁₂-dependent glycerol dehydratase in complex with cobalamin and propane-1,2-diol. *European Journal of Biochemistry*, 269 (18): 4484-4494
- Yasuda S, Mukoyama M, Horikawa H, Toraya T und Morita H (2006)** Process for Producing 1,3-Propanediol and/or 3-Hydroxypropionic acid. Nippon Shokubai Kagaku Kogyo Co.LTD., JP [EP 1731604 A1]
- Yu H, Gu G und Song L (1996)** Degradation of Polyvinyl Alcohol in Sequencing Batch Reactors. *Environmental Technology*, 17 (11): 1261-1267
- Yunmbam MK und Roberts JF (1992)** The in vitro efficacy of reuterin on the culture and bloodstream forms of *Trypanosoma brucei brucei*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Comparative Pharmacology*, 101 (2): 235-238
- Yunmbam MK und Roberts JF (1993)** In vivo evaluation of reuterin and its combinations with suramin, melarsoprol, DL- α -difluoromethylornithine and bleomycin in mice infected with *Trypanosoma brucei brucei*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Comparative Pharmacology*, 105 (3): 521-524
- Zamudio-Jaramillo MA, Hernandez-Mendoza A, Robles VJ, Mendoza-Garcia PG, Espinosa-de-los-Monteros J, Joel und Garcia HS (2009)** Reuterin production by *Lactobacillus reuteri* NRRL B-14171 immobilized in alginate. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, 84: 100-105
- Zeng A-P, Menzel K und Deckwer WD (1996)** Kinetic, dynamic, and pathway studies of glycerol metabolism by *Klebsiella pneumoniae* in anaerobic continuous culture. 2. Analysis of metabolic rates and pathways under oscillation and steady-state conditions. *Biotechnology and Bioengineering*, 52 (5): 561-571
- Zhao L, Zheng Y, Ma XY und Wei DZ (2009)** Effects of over-expression of glycerol dehydrogenase and 1,3-propanediol oxidoreductase on bioconversion of glycerol into 1,3-propanediol by *Klebsiella pneumoniae* under micro-aerobic conditions. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 32 (3): 313-320

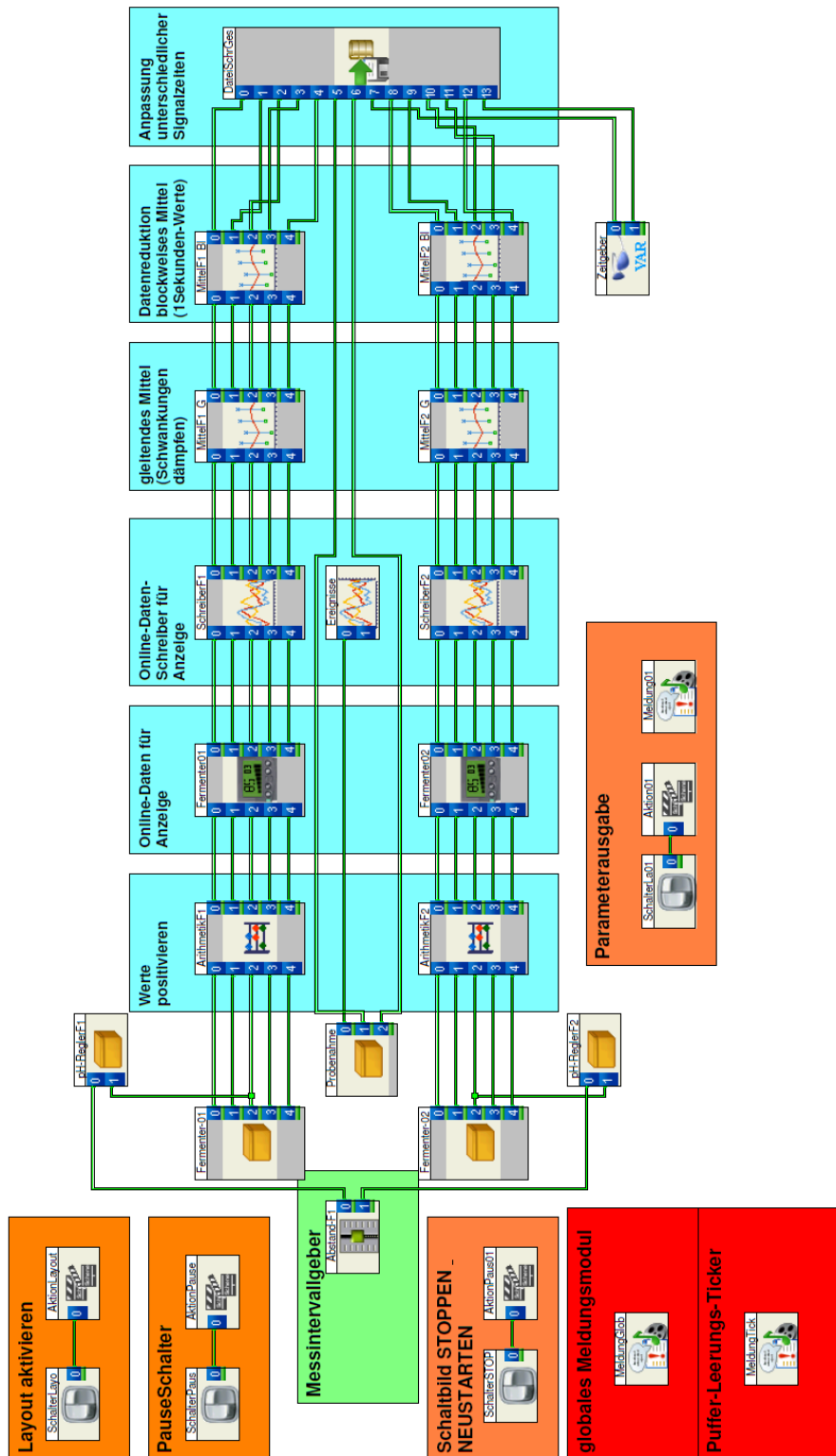
- Zheng P, Wereath K, Sun JB, van den Heuvel J und Zeng A-P (2006)** Overexpression of genes of the *dha* regulon and its effects on cell growth, glycerol fermentation to 1,3-propanediol and plasmid stability in *Klebsiella pneumoniae*. *Process Biochemistry*, 41 (10): 2160-2169
- Zheng Z-M, Cheng KK, Hu QL, Liu HJ, Guo NN und Liu DH (2008)** Effect of culture conditions on 3-hydroxypropionaldehyde detoxification in 1,3-propanediol fermentation by *Klebsiella pneumoniae*. *Biochemical Engineering Journal*, 39 (2): 305-310
- Zwiener C, Glauner T und Frimmel F (2002)** Method optimization for the determination of carbonyl compounds in disinfected water by DNPH derivatization and LC-ESI-MS-MS. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 372 (5): 615-621

7. Anhang

7.1 DasyLab®-Schaltpläne

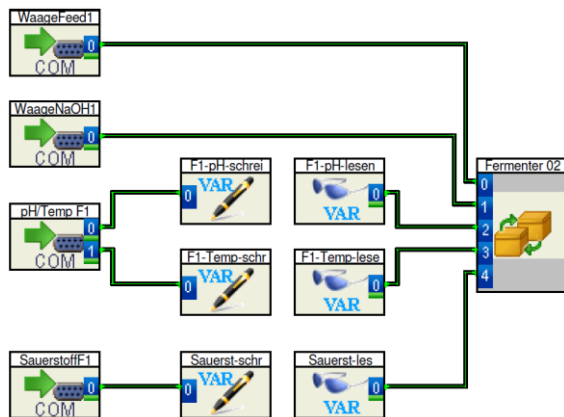
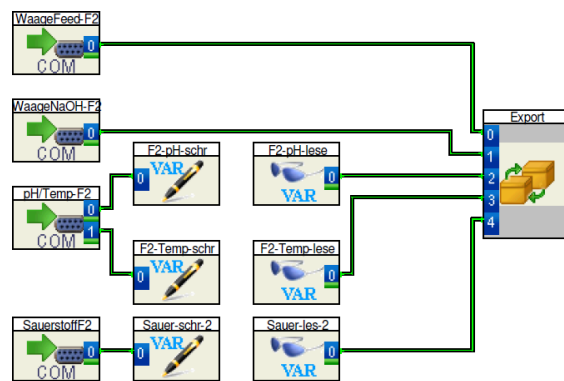
7.1.1 Optimiertes Schaltbild für das Doppelfermentersystem zur Biotransformation und Biomasseanzucht im Fed-Batch

Gesamtansicht:



Globale Einstellungen:

Zeitbasis			
Name	Samplerate [Hz]	Blockgröße	
DASYLab	100,000	1	
Treiber	1,000	1	
Globale Variablen			
ID	Name	Globale Variable	Berechnung
F1-pH-Wert SOLL	F1_PH_SOLL	7,000	
F1-pHGrenzEingabe01	F1_PH_GRENZE_01	0,020	
F1-pHGrenzEingabe02	F1_PH_GRENZE_02	0,060	
F1 Grenze 01	PH1_G01	6,980	$\$(F1_PH_SOLL) - \$(F1_PH_GRENZE_01)$
F1 Grenze 02	PH1_G02	6,940	$\$(F1_PH_SOLL) - \$(F1_PH_GRENZE_02)$
F2-pH-Wert SOLL	F2_PH_SOLL	7,000	
F2-pHGrenzEingabe01	F2_PH_GRENZE_01	0,020	
F2-pHGrenzEingabe02	F2_PH_GRENZE_02	0,060	
F2 Grenze 01	PH2_G01	6,980	$\$(F2_PH_SOLL) - \$(F2_PH_GRENZE_01)$
F2 Grenze 02	PH2_G02	6,940	$\$(F2_PH_SOLL) - \$(F2_PH_GRENZE_02)$
	F1_PH_VAR	7,000	
	F2_PH_VAR	7,000	
	F1_TEMP_VAR	35,000	
	F2_TEMP_VAR	35,000	
	FEED	0,000	
	PROBENAHPME	0,000	

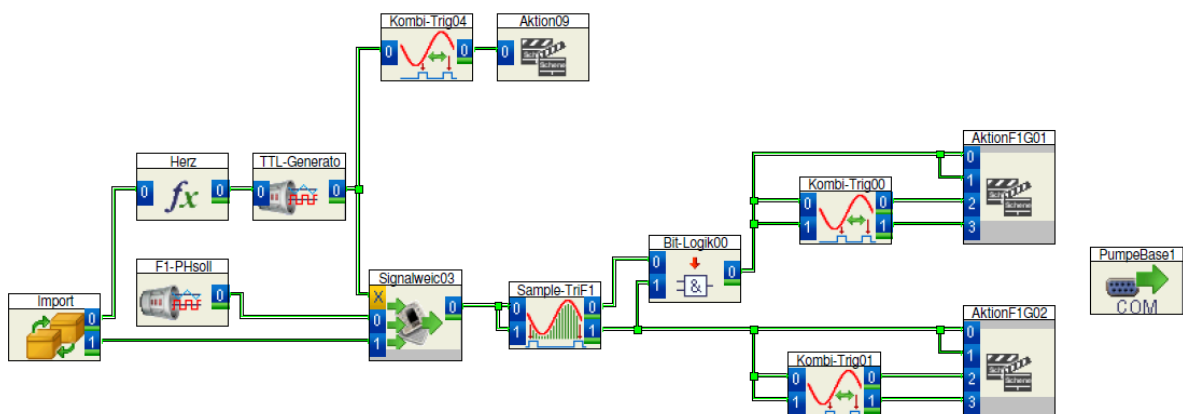
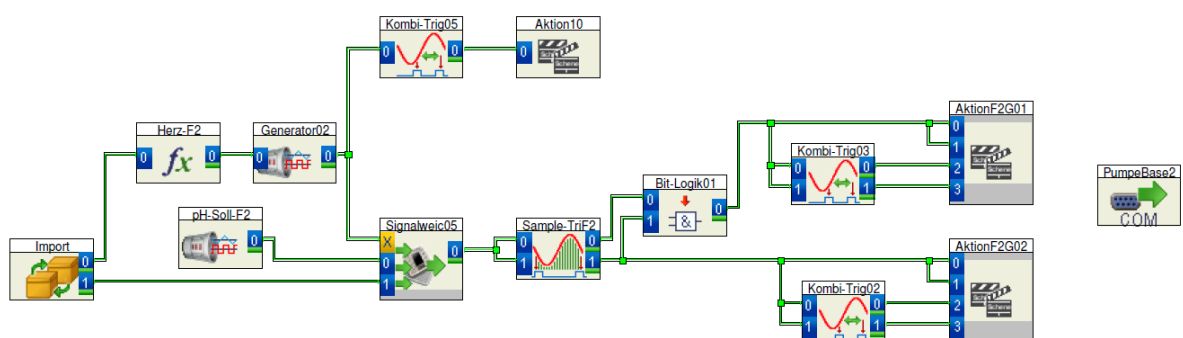
Blackbox - Fermenter 1:**Blackbox - Fermenter 2:**

Einstellung COM-Modul für WTW pH-Meter 340i:

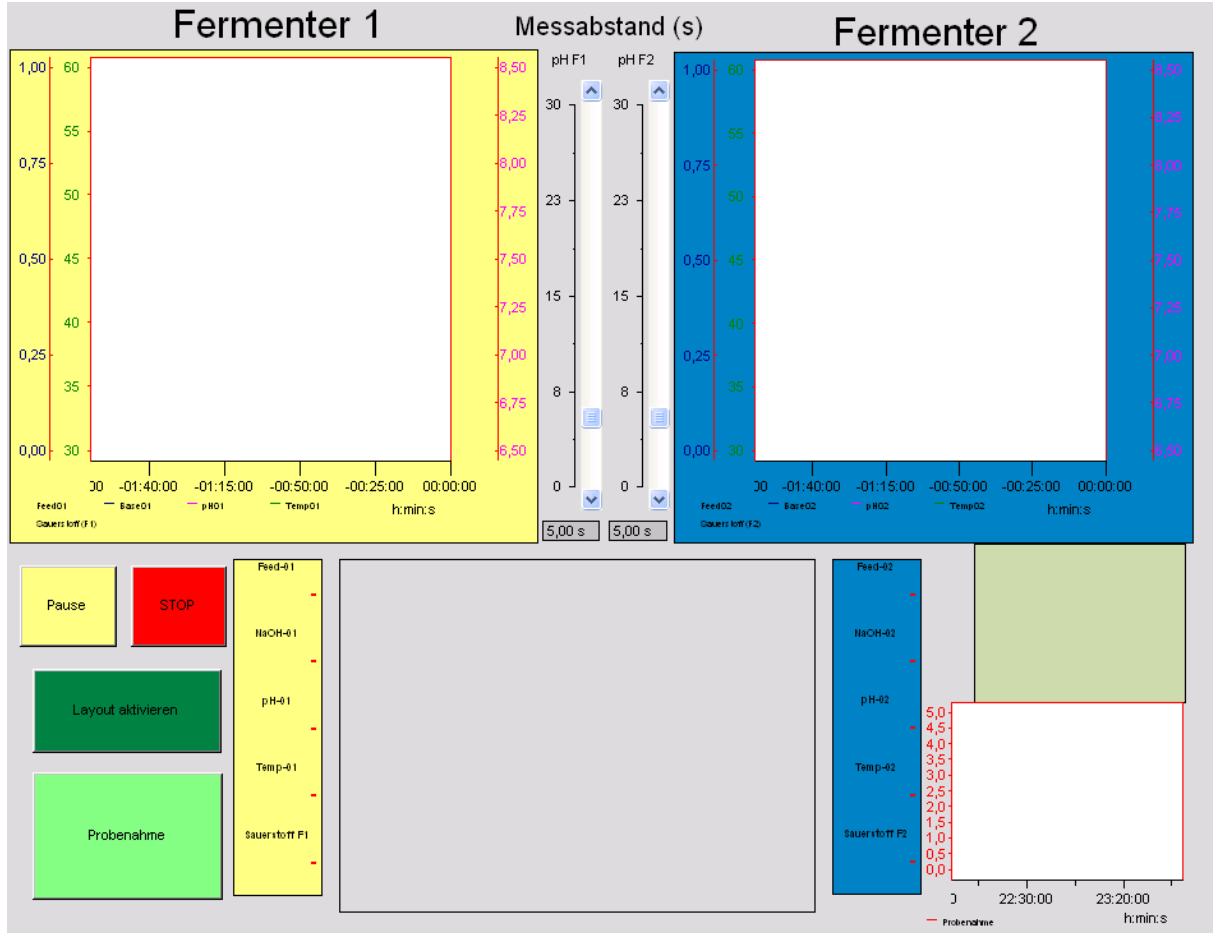
```

Module_Type = 'RS232Ein';
Channel_Name[0] = 'pH';
Channel_Name[1] = 'Temp';
Time_Distance = 1;
Data_Request_Command[0] = 'K.7\r';
Data_Request_Command[1] = 'K.7\r';
Data_Format[0] = '"pH"2x5a';
Data_Format[1] = '6x4a \r';
Header_Size = 0;
Com_Port = 10;
Baud_Rate = 5;
Data_Bits = 2;
Stop_Bits = 2;
Parity = NONE;
Buffer_In_Size = 1;
Buffer_Out_Size = 1;
Data_Request_Necessary = YES;
Sample_Per = CHANNEL;
Re_Send = YES; Handshake = 4;
Is_Master = TRUE

```

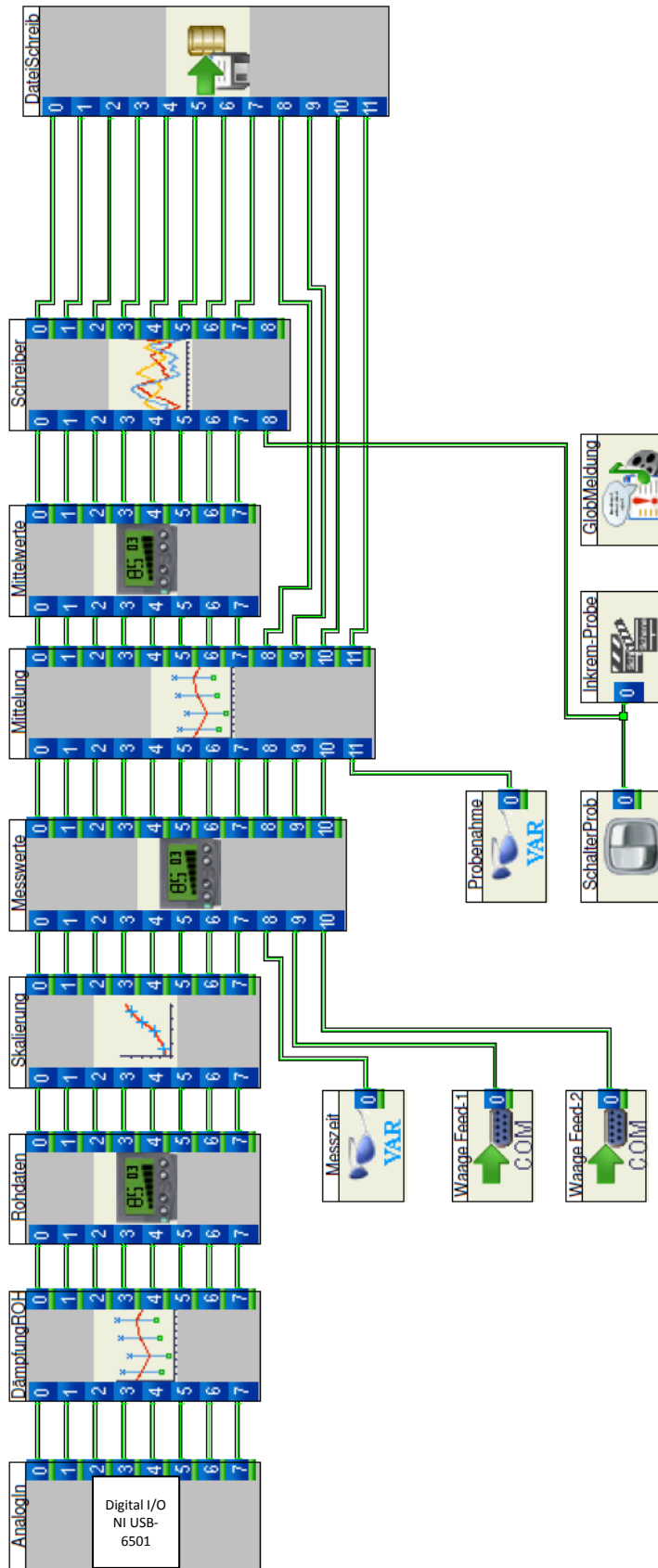
pH-Regelung Fermenter 1:**pH-Regelung Fermenter 2:**

Layout:



7.1.2 Erweitertes Schaltbild für BiostatE® zur Biomasseanzucht im 10-L-Fed-Batch

Gesamtansicht:



Danksagung

Mein ganz besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Klaus-Dieter Vorlop für die Überlassung des interessanten, fordernden und facettenreichen Themas sowie das mir allzeit entgegengebrachte Vertrauen. Sein stetes Interesse an der Arbeit, seine hilfreichen Anregungen und seine Diskussionslust haben wesentlich zu dem Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

Herrn Prof. Dr. Adrian Schumpe möchte ich herzlich für sein Interesse an meiner Arbeit und die Übernahme des Koreferates danken.

Herrn apl. Prof. Siegmund Lang danke ich herzlich für den Vorsitz der Prüfungskommission.

Insbesondere danke ich Herrn Dr. Thomas Willke für die hervorragende wissenschaftliche Betreuung der Arbeit, die vielfältigen Anregungen und hilfreichen sowie tiefgreifenden Diskussionen, auch über das Laborgeschehen hinaus. Sein persönliches Interesse an meiner steten Weiterentwicklung in der instrumentellen Analytik und der Verfeinerung meiner Prosa waren unverzichtbar.

Ich danke meinem Projektmitarbeiter Herrn Dr. Taher Sahlabji für die weiteren Forschungsarbeiten zum Reaktionsmechanismus der Produktbildung und für den Kulturaustausch.

Dem Creavis - Science to Business Center der Evonik Degussa GmbH danke ich für den Anstoß und die finanzielle Unterstützung des Projektes.

Speziell Herrn Dipl.-Ing. Dennis Jäger danke ich für die vielfältige analytische Unterstützung bei der Massenspektrometrie, Raman- und IR-Spektroskopie sowie im Besonderen für die Spezialisierung meiner HPLC-Analytik-Kenntnisse und sein mir entgegengebrachtes Vertrauen bei der Überlassung der HPLC-Anlage.

Ein großer Dank geht an Frau Doris Steinkraus für ihre über das Geforderte hinausgehende Bereitschaft, meine unzähligen und schwierigen Probenanalysen durchzuführen, für ihr offenes Herz und dem Mund am rechten Fleck. Ohne Sie wäre das Labor im Souterrain nicht so abwechslungsreich gewesen.

Ich bedanke mich außerdem bei allen Kollegen des Instituts für Agrartechnologie des Johann Heinrich von Thünen Institutes Braunschweig für das sehr angenehme Arbeitsklima und insbesondere der Biotruppe für die vielseitige Hilfestellung, Diskussion und Motivation während der gesamten Arbeit. Mein Dank gilt vor allem Frau Diana Hortig, Frau Dr. Anne Ringel, Frau Dr. Susann Baumert, Herrn Dr. Erik Wilkens und Frau Dr. Claudia Wilkens für die gemeinsame Zeit fern ab von Anaerobierkammer und Rollrandflasche.

Mein außerordentlicher Dank gilt nicht zuletzt meinen Eltern und meiner Schwester für ihre vielfältige Unterstützung, ihre Förderung und ihren Rückhalt von klein auf. Ohne sie wäre ich nicht so weit gekommen.

Schließlich möchte ich meiner innig geliebten Frau Steffi für ihre Pendelbereitschaft, ihre unerschütterliche Geduld, ihr Verständnis und ihre überragenden Fähigkeiten beim kritischen Korrekturlesen bedanken.

Vielen Dank für unsere Tochter Ronja Karlotta Sophie.

Curriculum Vitae

Persönliche Daten:

Name: Hendrik Krauter
Familienstand: Verheiratet, eine Tochter
Geburtsdatum: 07.05.1980
Geburtsort: Jena, Thüringen

Schulische Bildung:

1986 - 1989 Polytechnische Oberschule Jena-Göschwitz
1990 - 1992 Polytechnische Oberschule Dr. Theodor Neubauer, Jena
1992 - 1998 Staatliches Gymnasium Ernst-Haeckel, Jena
Juli 1998 Allgemeine Hochschulreife, Abitur

Studium:

2000 - 2007 Biologiestudium (Diplom) an der Friedrich-Schiller-Universität Jena, Hauptfach Mikrobiologie, Nebenfächer Genetik und Botanik
2006 - 2007 Diplomarbeit zum Thema „Untersuchungen zur Beteiligung membranständiger redoxaktiver Komponenten bei der Dehalorespiration in *Sulfurospirillum multivorans*“ am Lehrstuhl für Angewandte und Ökologische Mikrobiologie der Friedrich-Schiller-Universität Jena

Promotion:

2007 - 2010 Wissenschaftlicher Mitarbeiter am Johann Heinrich von Thünen-Institut (vTI), Braunschweig, Bundesforschungsinstitut für Biosystemtechnik und Agrartechnologie, ehemals Bundesforschungsanstalt für Landwirtschaft (FAL);
Promotion zum Thema „Optimierung der biotechnischen Herstellung von 3-Hydroxypropionaldehyd aus Glycerin – Erhöhung der Standzeit und der Produktivität des Biokatalysators *Lactobacillus reuteri* SD2112 durch den Fängerstoff Carbohydrazid“ unter der Betreuung von Prof. Dr. Klaus-Dieter Vorlop